

# REBIOLEST

REVISTA CIENTÍFICA DE ESTUDIANTES



Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Nacional de Trujillo

Volumen 1 , Número 2

Julio - Diciembre, 2013





## Las tesis en la carrera de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo.

Derivada del [método científico](#), una tesis es la aseveración concreta de una idea que, de manera fundamentada, se expone públicamente; es, en realidad, una [teoría científica](#) toda vez que puede ser considerada ya como parte del conocimiento estado, en cuanto: tiene una conclusión clara, novedosa y definida, no limita a ninguna otra tesis aceptada, no contiene ninguna contradicción lógica, ha sido contrastada y, sobre todo, no es una sesgada opinión del autor.

El Estatuto de la Universidad Nacional de Trujillo, en su Capítulo VIII, Art. 18, señala a la presentación, sustentación y aprobación de una tesis, como una de las posibilidades para obtener el Título Profesional de Primera Especialidad y cuenta para ello con el Reglamento General para otorgamiento de Grados Académicos y Títulos Profesionales, de la cual se ha derivado el Reglamento de Normas Específicas para obtener el título profesional de Biólogo, Biólogo Microbiólogo y Biólogo Pesquero con el que cuenta la Facultad de Ciencias Biológicas. En concordancia con ello, por encima del 98%, los exalumnos de la carrera profesional de Microbiología y Parasitología, en forma individual y en un periodo no menor a los seis meses, desarrollan, sustentan y aprueban las tesis en sesiones públicas, oficializados con Resolución y actas y calificadas con formatos preestablecidos y proporcionados por la Dirección de Escuela.

Sin embargo, tal como ha sido señalado por el Señor Decano, Dr. Hermes Escalante, las tesis se desarrollan en un tiempo adicional a los 10 ciclos académicos que tiene de duración la carrera profesional, aspecto que se contradice con lo que se establece en el Criterio 3.1: Generación y Evaluación de Proyectos de Investigación con los estándares 46-55 del Modelo de Calidad para la Acreditación de las Carreras Profesionales Universitarias de Ciencias Biológicas, propuesta por el CONEAU, donde claramente se señala que la tesis es “un trabajo final de carrera”. Por esta razón, y a manera de propuesta, se ha planteado que las tesis deberían desarrollarse como dos cursos: Tesis I y Tesis II en los ciclos finales y que debiera darse posibilidad a que la investigación se haga individualmente o alternativamente entre dos alumnos y en un tiempo no mayor a un año ni menor a los cuatro meses.

Al mismo tiempo, tal como se ha hecho con la investigación formativa, los resultados del trabajo final de carrera o tesis deben ser convenientemente comunicados; por esta razón REBIOLEST ofrece las páginas del segundo número de cada volumen anual para publicar los resultados de estas investigaciones, lógicamente, transformadas por un comité especial en un artículo en concordancia con las Normas de la Revista, y revisadas por expertos, para cumplir con requisitos de publicaciones internacionales.

**Foto de la portada:** "Rana Venenosa" *Ameerega macero* (Rodríguez & Myer, 1993). Pertenece a la familia Dendrobatidae. Se distribuye en la amazonía, fue registrada en la reserva Nacional del Manu; Urubamba y río Alto Purus, Loreto. Estado de conservación PREOCUPACIÓN MENOR (LC). Foto gentilmente proporcionada por el estudiante de la Carrera de Ciencias Biológicas **Irwing Smith Saldaña Ugaz**



## Contenido/Contents

### Editorial

Las tesis en la carrera de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo. **El Editor** ..... 2

**Contenido/Contents** ..... 3

### Artículos originales/Original papers

- Balance hídrico para uso agrícola en la Cuenca Media y Baja del río Moche, área de influencia del Proyecto Especial CHAVIMOCHIC, Perú. 2010/ **Water balance for agricultural use in Moche River middle and lower Basin, influence area of CHAVIMOCHIC special project, Peru. 2010.** JUAN E. PAREDES-ACOSTA, ANA M. GUERRERO-PADILLA ..... 5
- Capacidad acumuladora de cadmio en raíces de *Scirpus californicus* expuestas a diferentes concentraciones de nitrato de cadmio en condiciones de laboratorio/**Accumulating capacity of cadmium in *Scirpus californicus* roots exposed to different concentrations of cadmium nitrate under laboratory conditions.** LILI E. FERNÁNDEZ-AGUILAR, SANTOS ENRIQUE PADILLA..... 14
- Determinación del Fenómeno L.E. (Lupus eritematoso) por efecto de la aplicación del Procainamida (Biocoryl®) en *Cavia porcellus* (cobayo)/**Determination of L.E. (Lupus Erythematosus) phenomenon by effect of the application of Procainamide (Biocoryl®) in *Cavia porcellus* (guinea pig).** CÉSAR CABREJOS M., KATHERINE IPANAQUÉ M., CARLOS ESPINOZA V. ....23
- Sensibilidad antibacteriana de cultivos de *Listeria* sp. aislados de lugares de expendio de pollo y quesos en mercados de la ciudad de Trujillo (Perú)/**Antibacterial sensitivity *Listeria* sp. cultures isolated from chicken and cheeses outlay in Trujillo (Peru) markets.** J. VEGA, P. MERCADO ..... 28
- Supervivencia de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* en agua potable de cuatro distritos de Trujillo (Perú)/**Survival of *Salmonella typhi* and *Salmonella enteritidis* in drinking water of four Districts from Trujillo (Peru).** RAQUEL MOYA-EGOAVIL, PEDRO ALVARADO-SALINAS, NELLY VÁSQUEZ-VALLES..... 34
- Concentración Mínima Inhibitoria del extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Baccharis genistelloides*, *Perezia multiflora*, *Senecio sublutescens* y *Jungia paniculata* del Parque Nacional Huascarán (Perú) frente a cepas bacterianas de interés clínico/**Minimum Inhibitory Concentration of hydroalcoholic extract of stems and leaves of *Baccharis genistelloides*, *Perezia multiflora*, *Senecio sublutescens*, and *Jungia paniculata* from Huascarán National Park (Peru) against bacterial strains of clinical interest.** EDWIN VEGA PORTALATINO, ELOY LÓPEZ MEDINA ..... 43
- Eficacia de la Técnica de Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay con antígenos de Excreción-Secreción de Tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas/**Effectiveness of Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay Technique with excretion-secretion antigens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to Chagas disease diagnose.** OLGA SANABRIA, HERMES ESCALANTE..... 50



- Antígenos del líquido seudocelómico de *Ascaris suum* detectados por Western Blot utilizando IgY producidos en *Gallus gallus* var. Hisex Brown/**Seudocelomic fluid antigens of *Ascaris suum* detected by Western Blot technique using IgY produced in *Gallus gallus* var. Hisex Brown.** MARIO D. ARTEAGA-GARCIA, CESAR A. JARA..... 58
- Efecto de *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre huevos de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio/***Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* effect on *Meloidogyne* sp.eggs under laboratory conditions.** GICELLY A. T. MENDOZA, JUAN H. WILSON, JUAN C. COLINA<sup>3</sup> ..... 65
- Prevalencia del parasitismo por *Eimeria* en bovinos, *Bos taurus*, del Distrito Pacanga (La Libertad, Perú) y su relación con factores sociodemográficos y ambientales/**Prevalence of parasitism by *Eimeria* in cattle, *Bos taurus*, from Pacanga (La Libertad, Peru) District and its relationship to sociodemographic and environmental factors.** JUAN C. COLINA, GICELLY A. MENDOZA, CESAR A. JARA..... 72
- Crianza de *Oreochromis niloticus* Var chitralada en sistema bio-floc en la Empresa PRODUMAR SA, Guayaquil (Ecuador)/**Breeding of *Oreochromis niloticus* Var Chitralada in bio-floc system in the PRODUMAR SA Company, Guayaquil (Ecuador).** MANUEL D. CEDANO-CASTRO, ANGELO LUJAN-BULNES, HAMILTON SUÁREZ MARÍN ..... 79

**Guía para los autores**.....92



# Balance hídrico para uso agrícola en la Cuenca Media y Baja del río Moche, área de influencia del Proyecto Especial CHAVIMOCHIC, Perú. 2010

Water balance for agricultural use in Moche River middle and lower Basin, influence area of CHAVIMOCHIC special project, Peru. 2010

Juan E. Paredes-Acosta<sup>1</sup> y Ana M. Guerrero-Padilla<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tesista de la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas. <sup>2</sup>Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú

## RESUMEN

Con el propósito de obtener un adecuado aprovechamiento del recurso hídrico y planificar con exactitud su utilización, se determinó la demanda y uso de agua de la cuenca del río Moche (La Libertad, Perú). Los volúmenes hídricos disponibles para el uso agrario variaron de acuerdo a la estacionalidad incrementándose en los meses de venidas: el 69 % se produce de Febrero a Abril. La investigación se desarrolló en la Cuenca Media Baja del río Moche, área de influencia del Proyecto Especial CHAVIMOCHIC, en los sectores de Los Comunes, Mochica, El Moro, Poroto, Quirihuac, Samne, Santa Lucía de Moche, Santa María Valdivia, Santo Domingo Huatape, Simbal y Vichanzao. Los volúmenes de agua colectada presentaron un excedente o superávit, lo cual benefició en la distribución para cada riego de cultivo durante el año agrícola 2009-2010. Los cultivos predominantes fueron los transitorios (*Oryza sativa* “arroz” principalmente), respecto de los permanentes (*Zea mays* “maíz” principalmente), variando su cultivo de acuerdo al sector, vinculado al mercado y desarrollo que estos tengan.

**Palabras clave:** Demanda de agua, uso de agua, Cuenca del río Moche.

## ABSTRACT

Demand and water use at Moche river basin (La Libertad, Peru), in order to be able to obtain suitable advantage of the hydrological resource and to plan with certainty its use was determined. Available hydrological volumes to agriculture use varied according to seasonality increasingly since February to April, reaching the highest volumes represented 69 % of all. This research was developed at Moche river basin, influence area of Special Project CHAVIMOCHIC, at Los Comunes, Mochica, El Moro, Poroto, Quirihuac, Samne, Santa Lucía de Moche, Santa María Valdivia, Santo Domingo Huatape, Simbal y Vichanzao sectors. Water volume collected had exceeding, giving more advantages to water crops, during 2009-2010 agriculture year. The predominant agriculture was the transitory ones (*Oryza sativa* “rice”, mainly), in greater volume than the permanent agriculture (*Zea mays* “maize”, mainly), varying culture in order to sector related to offer and demand and develop of those.

**Key words:** Water demand, water use, Moche river Basin



## INTRODUCCIÓN

El agua constituye el elemento básico para la vida en la Tierra, pero también representa el motor fundamental de las actividades primarias del hombre como la agricultura, ganadería y pesca. En este sentido, los recursos hídricos en la actualidad se perfilan como uno de los factores de conflicto más importantes en los últimos siglos para la sociedad en su conjunto, debido sobre todo a su disponibilidad, calidad y distribución<sup>1</sup>. Se definen además como “recursos disponibles o potencialmente disponibles en cantidad y calidad suficiente, en un lugar y en un periodo de tiempo apropiados para satisfacer una demanda identificable”<sup>2</sup>. Caracterizándose, por la capacidad natural que tiene de renovarse mediante el ciclo hidrológico, logrando que la cantidad total existente en el planeta no pueda ni aumentar ni disminuir, es decir se mantenga constante<sup>3</sup>.

Las características y comportamiento de los recursos hídricos en nuestro país son muy peculiares debido a la influencia que la Orografía a sabido definir<sup>4</sup>. El concepto neoclásico de eficiencia de irrigación es desarrollado como consecuencia de la evolución del interés de irrigar desde un punto de vista de sistemas transportadores de agua para la perspectiva externa del manejo y la política de la irrigación dentro del contexto de recursos hídricos como un todo, en toda la cuenca del río<sup>5</sup>.

La agricultura es el principal sistema consumidor de agua en la mayoría de los países. En ella se utilizan fuertes volúmenes para riego tanto en pequeños como en grandes sistemas; sin embargo, normalmente las eficiencias de aprovechamiento son muy bajas<sup>6</sup>. El recurso jurídico que avala la preocupación actual del Estado Peruano por los recursos hídricos se encuentra contenido en la Ley de Recursos Hídricos (Ley N° 29338), la cual promulga el uso y gestión integrada del agua, la actuación del Estado y los particulares en dicha gestión, así como los bienes asociados a estas, ahondado en su artículo N° 10.

La cuenca hidrológica es la unidad natural para planear el uso eficiente del agua y evaluar sus resultados, pues en ella se localizan ciudades, industrias, plantas hidroeléctricas, distritos de riego y granjas acuícolas<sup>5</sup>. Una de las razones principales de este estudio es que toman especial relevancia, es la carencia de estudios que permitan conocer la dinámica del sistema hidrológico, lo que impide la implementación de programas de desarrollo ya sea para uso poblacional, “sistema de abastecimiento de agua y saneamiento”; con fines de aprovechamiento agrícola “riego” y pecuario “consumo y mejoramiento de forraje”, con fines de uso industrial, y conservación de suelos, entre otros, y solo se dará a conocer de la problemática anterior determinando el balance del recurso hídrico de la Cuenca del río Moche<sup>1</sup>.

Los recursos hídricos superficiales del área del Proyecto están constituidos por los aportes del río Moche. El escurrimiento superficial de la cuenca del río Moche se debe principalmente a las precipitaciones estacionales que ocurren frecuentemente entre Noviembre y Abril. En esta cuenca no existen obras de represamiento natural del río<sup>6</sup>.

Las aguas del río Moche son derivadas y conducidas para el riego de las tierras agrícolas del valle, a través de un sistema de canales que están bajo operación y mantenimiento por los agricultores organizados en la Junta de Usuarios del valle de Moche y las Comisiones de Regantes por sector de riego. Los canales de riego más importantes son: Poroto, Quirihuac y Jesús María en la margen izquierda del río Moche en la parte alta; Huatape, Santo Domingo, y La General de Santa Lucía de Moche en la parte baja. En la margen derecha del río Moche tenemos los canales de Shirán, Catauay, Santa Rosa en la parte alta y El Moro, Wichanzao y La Mochica, en la parte baja. Los canales de la parte baja del valle son abastecidos complementariamente con las aguas provenientes del río Santa por el Proyecto Especial CHAVIMOCHIC<sup>7</sup>.

La formación vegetal que ofrece excelentes condiciones para la agricultura intensiva bajo riego, es el desierto pre-montano, que se encuentra ubicado entre las cotas de 0 a 900 m.s.n.m., en lo pecuario permite establecer centros de explotación avícola y de ganadería con muy buenos resultados, no permitiendo el desarrollo de una agricultura extensiva, existe la presencia de pastos naturales lo que fomenta la crianza de



ganado, se encuentra ubicado entre las cotas de 3 700 a 4 200 m.s.n.m., es la pradera muy húmedo montano<sup>8</sup>.

Teniendo en cuenta que no se cuenta con antecedentes sobre el tratamiento del balance hídrico en las cuencas de los ríos del Perú, se propuso la presente investigación que estuvo dirigida a determinar el balance hídrico en la Cuenca Media y Baja del Río Moche (Trujillo, La Libertad, Perú), área de influencia del Proyecto Especial CHAVIMOCHIC.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Área de Estudio:

Geográficamente, la cuenca limita por el Norte, con la cuenca del río Chicama, por el Sur, con la cuenca del río Virú, por el Este, con la cuenca del río Santa y por el Oeste, con el Océano Pacífico. Sus puntos extremos se hallan comprendidos entre los paralelos 7° 46' y 8° 15' de latitud Sur y los meridianos 78° 16' y 79° 09' de longitud occidente de Greenwich. Ésta, cubre en total una extensión total de 2 708 km<sup>2</sup>, y su cuenca húmeda, la más importante de la región, con una extensión de 1418 km<sup>2</sup>, y la longitud máxima de recorrido, desde sus nacientes hasta su desembocadura es de 102 km. Está ubicada políticamente en las provincias de Trujillo, Otuzco y Santiago de Chuco, pertenecientes al departamento de La Libertad.<sup>10</sup> Altitudinalmente, se extiende desde el nivel del mar hasta la línea de cumbres de la Cordillera de los Andes, que constituye la divisoria de las aguas entre esta cuenca y la del río Marañón, y cuyos puntos más altos están sobre los 4 000 m.s.n.m.<sup>9</sup>

### Determinación de volúmenes:

Se realizó la estimación de extensión territorial, en base a las áreas declaradas por los agricultores, de cada sector estudiado, donde llenan en un formato llamado Declaratoria de Intensión de Riego (DIR), previos al inicio de cada campaña agrícola anual, el número de hectáreas que trabajaran, coordinando la cantidad de agua para el riego. Luego se determinó las cantidades de agua colectadas provenientes de diferentes fuentes, las cuales luego serán distribuidas, en este caso para fines de riego agrícola. Las cantidades proyectadas para el riego de cada tipo de cultivo están dadas en la literatura, determinándose por el coeficiente de cultivo, y su desarrollo fenológico, pudiendo variar en cultivos transitorios y permanentes. Se determinó los volúmenes empleados para el uso agrícola desde agosto del 2009 hasta julio del 2010, en la Cuenca Media Baja del Río Moche

E.g.: tomemos como ejemplo el cultivo de Ají escabeche.

Desarrollo fenológico: 6 meses.

Módulo (m<sup>3</sup>/ha.): 6,6 (sumatoria total durante el periodo)

$$\text{Volumen: } 6,6 \text{ (m}^3\text{/ha.)} * \text{N}^\circ \text{ de has. Declaradas para su siembra del cultivo (ha.)}$$

### Diagnóstico del uso y aprovechamiento del Recurso Hídrico:

Las cantidades de agua proyectadas a coleccionar y las demandadas para el riego de cultivos, fueron contrastadas, con la finalidad de demostrar la existencia de excedentes o déficits, los cuales demuestran el ritmo de aprovechamiento del recurso. Se realizó el diagnóstico de la cuenca a fin de establecer las condiciones en las cuales se hace uso del recurso hídrico para las actividades agrícolas en el Valle Moche, reuniéndose información del Ministerio de Agricultura, Juntas de Usuarios del Valle y del Proyecto Especial CHAVIMOCHIC.

### Imagen Satelital:

Se empleó la imagen satelital de la Autoridad Nacional de Aguas, de la Cuenca del río Moche, a fin de ubicar la zona de estudio.

## RESULTADOS

En la cuenca del río Moche, se ha establecido el Proyecto Especial CHAVIMOCHIC, el cual administra parte de las aguas del río, para mejorar la eficiencia de uso del agua controlando las demandas de los volúmenes para el riego de los cultivos, racionándolos de acuerdo a los niveles de precipitación y cargas volumétricas anuales, que sirven para abastecer las demandas consuntivas de los terrenos para riego, urbanos y sin uso.

El uso de agua empleada por los agricultores fue estimado con anterioridad (Julio 2009), para el abastecimiento de agua administrada por el P.E. CHAVIMOCHIC, considerando el tipo de cultivo sembrado. Se estimó un consolidado de 13 568.43 Ha bajo riego, considerándose 9 599.85 Ha declaradas con intención de siembra (Tabla 1).

La disponibilidad superficial hídrica con el 75 % de precipitación total fue 114 MMC (Millones de Metros Cúbicos), incrementándose la disponibilidad durante los meses de Febrero, Marzo y Abril. Las otras fuentes de agua aportaron en total 41 MMC, pudiendo administrar un total de 186 MMC, para el año agrícola Agosto 2009 – Julio 2010 (Tabla 2).

La demanda bruta de agua para uso agrícola estuvo relacionada con las declaraciones de intención de siembra de cultivos de cada agricultor, siendo mayor en el mes de Noviembre, debido a que la mayoría de estos tiene un periodo vegetativo corto, y están listos para cosecharse a los 4 meses, luego de su siembra (Tabla 3).

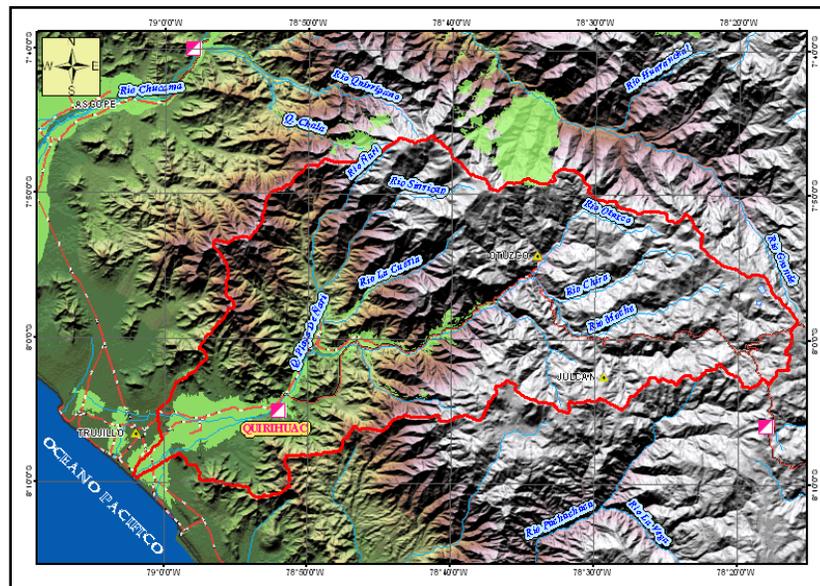


Fig. 1: Cuenca del río Moche (imagen satelital – Autoridad Nacional de Aguas (ANA) 2010)

Tabla 1: Declaración de Intención de Siembras (DIS) del Plan de Cultivo y Riego (PCR), Cuenca Media Baja Moche, Agosto 2009 – Julio 2010



COMISION DE REGANTES	AREA BAJO RIEGO (HAS)	CAMPAÑA AGRICOLA 2009-2010	
		DIS HAS	PORCENTAJE
Simbal	913.85	315.96	34.57
Samne	1,084.63	457.57	42.19
Poroto	1,864.02	740	39.70
Quirihuac	979.36	536.47	54.78
Santo Domingo	1,214.01	792.86	65.31
Vichanzao	1,138.06	943.41	82.90
El Moro	811.75	793.68	97.77
Mochica Alta	2,803.26	2925.19	104.35
Los Comunes	886.05	890.28	100.48
Santa María Valdivia	977.98	881.48	90.13
Santa Lucía de Moche	895.46	322.95	36.07
<b>TOTAL</b>	<b>13,568.43</b>	<b>9599.85</b>	<b>70.75</b>

DIS:Declaración de Intension de Siembra

Tabla 2: Disponibilidad Hídrica Con Fines Agrarios - Distrito De Riego

Dist. De Riego	Moche-Virú-Chao												Año Agrícola	Ago 2009-Jul 2010
MESES	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	TOTAL	
Reserv. In. Mes (a)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Disp. Sup. Al 75% (b)	870 M	1,010 M	2,310 M	3,470 M	5,920 M	13,000 M	22,530 M	43,030 M	34,370 M	13,000 M	3,470 M	1,590 M	144,570 M	
Ot. Fts. Agua ©	2,846 M	3,087 M	3,575 M	3,538 M	3,581 M	3,325 M	3,865 M	3,795 M	3,970 M	4,090 M	3,561 M	2,670 M	41,908 M	
Dem. Ot. Usos N.A. (d)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Disp. Hid. Fin. Agra. €	3,716 M	4,097 M	5,885 M	7,008 M	9,501 M	16,325 M	26,395 M	46,825 M	38,340 M	17,090 M	7,031 M	4,260 M	186,478 M	

Promedio Mensual 15,539 M

a: Reservoirio Inicio Mes

c: Otras fuentes de agua

e: Disponibilidad hídrica fines agrarios

b: Disponibilidad Superficial al 75%

d: Demanda de otros usos no agrícola

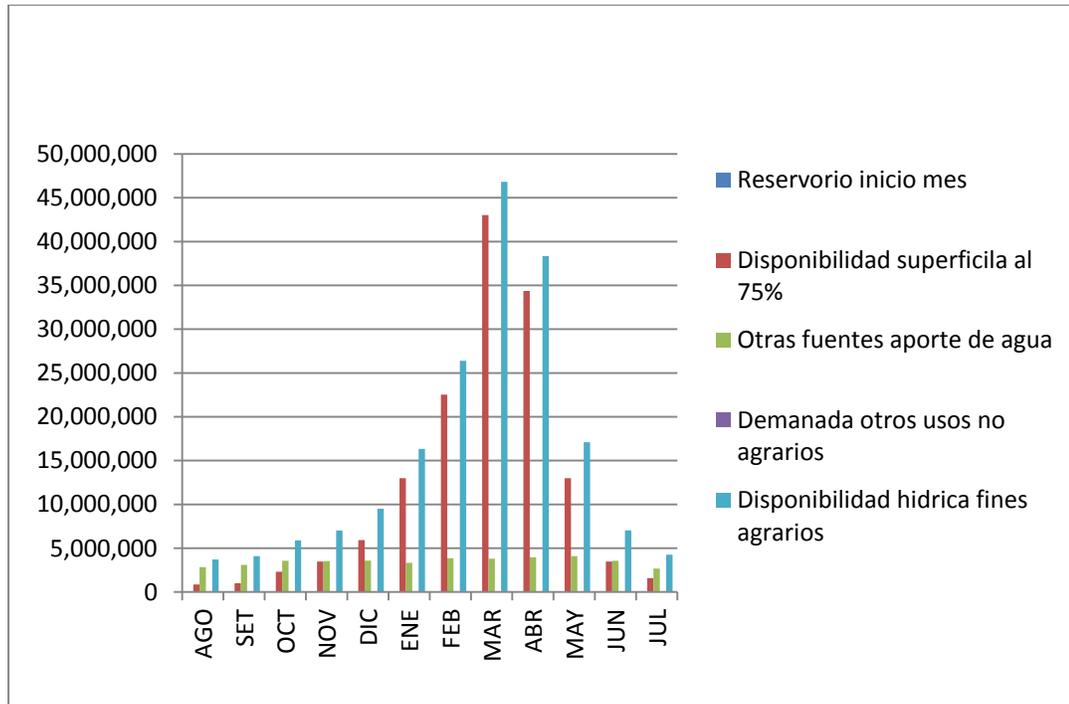


Fig. 2. Disponibilidad hídrica con fines agrícolas en los distritos de riego del Río Moche.

Tabla 3: Consolidado Total Demanda Bruta de Agua – Distritos o Sub Distritos de Riego

DEMANDA DE AGUA MENSUAL POR CANAL - M3

Dist. De Riego	Moche-Virú-Chao			Junta de Usuarios Moche			Año Agrícola Ago 2009-Jul 2010						
MESES	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	TOTAL
VOLUMEN	11,887 M	14,955 M	15,523 M	19,493 M	16,981 M	14,701 M	11,995 M	11,338 M	11,213 M	10,726 M	10,256 M	10,625 M	159,697 M
PROMEDIO MENSUAL							13,308 M						

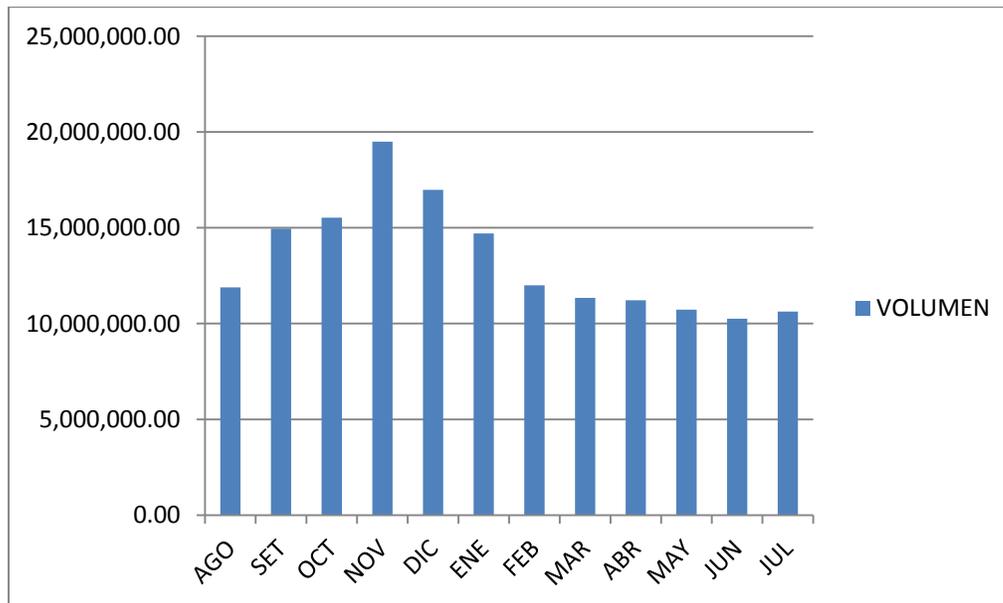


Fig. 3. Consolidado total demanda bruta de agua en los distritos o subdistritos de riego de la cuenca Baja del Río Moche

Los tipos de cultivos sembrados en el Valle Moche, y los terrenos no vinculados demuestran la predominancia del cultivo de *Zea mays* “maíz” en sus respectivas variedades, *Saccharum officinarum* “caña de azúcar” y *Oryza sativa* “arroz” (Tabla 4).

## DISCUSIÓN

En la cuenca media baja del río Moche, se desarrolla el Proyecto Especial CHAVIMOCHIC, el cual se encarga de administrar el uso de agua procedente de esta cuenca, para el abastecimiento de diferentes necesidades consuntivas, tales como el uso agrícola, uso urbano y terrenos son uso. Principalmente se desarrolla la actividad agrícola, siendo la actividad que sostiene el desarrollo de la Región La Libertad. Los volúmenes obtenidos por el Proyecto proceden de los canales alimentadores, y el río Santa, pero debido a la actual situación mundial del desabastecimiento gradual del agua es necesario realizar estudios concientizando la importancia de la conservación y adecuado manejo de los recursos hídricos, en la Cuenca del río Moche, la cual ha sido poco estudiada.

La demanda de riego total para el año agrícola Agosto 2009 – Julio 2010, fue de 159 697 631.45 m<sup>3</sup> donde alcanzó los picos más altos durante los meses de octubre, noviembre y diciembre, influenciado por las venidas propias de la estación. Se ha analizado y evaluado la disponibilidad y demanda hídrica mensual del río Moche, por un periodo de un año, demostrando el incremento de volúmenes captados en los últimos años por la administración realizada por el P. E. CHAVIMOCHIC.

Las descargas del río Moche, presentan una marcada estacionalidad; las que en un 69 % se producen de febrero a abril. El promedio mensual de los volúmenes descargados por el río Moche es de 15 539 916 m<sup>3</sup>.



Mientras que las demandas para 13 568.43 Ha bajo riego, de las cuales 9 599.85 Ha fueron declaradas con intensión de siembra, alcanzó 13 308 135.95 m<sup>3</sup> mensuales (Tabla 3 y Fig. 3).

En lo que respecta a la actividad agrícola, los tipos de cultivo predominante en la Cuenca del río Moche son los transitorios (*Oryza sativa* “arroz”, principalmente), en mayor volumen que los cultivos permanentes (*Zea mays* “maíz”, principalmente). El uso de agua disponible para este rubro asciende a 144 570 000 m<sup>3</sup>, procedentes de fuentes superficiales con una precipitación del 75 % y de otras fuentes asciende a 41 908 990 m<sup>3</sup> (Tabla 4).

El análisis y proyección de la cédula de cultivos para las áreas de uso agrícola, ha considerado cultivos de bajo consumo de agua y alta rentabilidad, propuestos por el Proyecto Especial CHAVIMOCHIC, asimismo se ha proyectado la rotación de cultivos estacionales de corto periodo vegetativo, como las cucurbitáceas y el tomate.

Tabla 4: Intención de Siembra Cultivo por Área (Has.), Agosto 2009-Julio 2010

CULTIVO	Área	Porcentaje
AJI	34.55	0.36
AJO	0.74	0.01
ALCACHOFA	13.70	0.14
ALFALFA	41.20	0.43
ARROZ	1.50	0.02
ARVEJA	28.31	0.29
CAMOTE	56.23	0.59
CAÑA DE AZUCAR	4,511.85	47.00
CEBADA	0.50	0.01
CEBOLLA	10.21	0.11
COCA	1.99	0.02
ESPARRAGO	124.02	1.29
FLORES FLORES	4.56	0.05
FORESTALES	20.81	0.22
FRIJOL	152.45	1.59
FRUTALES	718.67	7.49
GARBANZO	8.50	0.09
PASTOS	197.23	2.05
HORTALIZAS	683.63	7.12
LENTEJA BOCONA	63.32	0.66
MAIZ	2,078.36	21.65
MANI	1.80	0.02
PALLAR	10.50	0.11
PALTOS	93.21	0.97
PAPA	15.29	0.16
REPOLLO	15.67	0.16
TOMATE	46.66	0.49
TRIGO TRIGO	4.47	0.05
VARIOS CASAS CAMINOS CARRETERAS	24.53	0.26
VARIOS DESCANSO	193.48	2.02
VARIOS TERRENOS FILTRADOS	2.30	0.02
VARIOS VARIOS	5.30	0.06
YUCA	353.53	3.68
ZAPALLO	80.77	0.84
<b>TOTAL</b>	<b>9,599.84</b>	<b>100.00</b>

Las características de buena aptitud de suelos, y recursos hídricos disponibles por la regulación y administración del Proyecto Especial CHAVIMOCHIC, caracterizan al valle con buenas posibilidades de inversión y desarrollo que complementado con la incorporación de nuevas tecnologías y ampliaciones de infraestructuras para la captación del recurso hídrico puede permitir una explotación más eficiente.



## CONCLUSIONES

- Las descargas del año agrícola Agosto 2009 – Julio 2010, presentaron la disponibilidad y la demanda hídrica similares, en la Cuenca del Río Moche, en la cuenca baja dispone de más tierras agrícolas y de una mejor composición de terreno para el riego, mientras que en la cuenca media su uso es moderado, lo que limita su capacidad productiva.
- Los tipos de cultivo predominante en la cuenca del río Moche son los transitorios (*Oryza sativa* “arroz”, principalmente), en mayor volumen que los cultivos permanentes (*Zea mays* “maíz”, principalmente).
- La distribución de tierras es de acuerdo a las zonas de la cuenca; en la parte baja hay un predominio de pequeños agricultores, pudiendo obtener excedentes capitalizables fácilmente. Los cuales en la cuenca media se encuentran en menor escala.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Calizaya E. Balance Hidrológico de la Cuenca del río Huancané mediante el uso de los Sistemas de Información Geográfica. Tesis (Magister Science, mención en Recursos Hídricos). Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina, Escuela de Postgrado, 2008.
2. Guerrero M. En: Gestión Integrada de Recursos Hídricos de la cuenca del río Jequetepeque, Perú. Tesis (Doctor en Ciencias e Ingeniería, Mención en Ecología). Trujillo, Perú. Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Ciencias Biológicas, 2007
3. Valdivia P. Determinación del Balance Hídrico con fines de Riego en el Distrito de Coporaque, Provincia de Caylloma, Región Arequipa. Tesis (para obtención de Título de Ingeniero Agrícola). Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Ingeniería Agrícola, 2007
4. Picon A. Evaluación de la Disponibilidad de los Recursos Hídricos del Valle del Río Cunas con fines de Regulación. Tesis (para obtención del Título de Ingeniero Agrícola). Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Ingeniería Agrícola
5. Seckler D, Molden D, Sakthivadivel R. 1° International Water Management Institute, Colombo, Sri Lanka, The Concept of Efficiency in Water resources Management and Policy
6. Uso de Agua en la Actividad Agrícola. Disponible en: <http://www.cepis.ops-oms.org/eswww/fulltext/repind48/uso/uso.html>. [Fecha de consulta: 09 de julio del 2010; 12:30 pm]
7. Barces O. Estudio de Mejoramiento de la Infraestructura de la Campiña de Moche. Tesis (para obtención del título de Ingeniero Agrícola). Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Ingeniería Agrícola, 1989. 245 h.
8. Municipalidad Provincial de Trujillo (MPT), Atlas Ambiental de la Ciudad de Trujillo, Editorial Quebecor World Perú S.A., 2002
9. Ancajima R. Análisis de Alternativas de Planificación de Cultivos mediante Programación Lineal. Caso CHAVIMOCHIC – Sector 1. Tesis (para obtención del Título de Ingeniero Agrícola). Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Ingeniería Agrícola, 1993.



# Capacidad acumuladora de cadmio en raíces de *Scirpus californicus* expuestas a diferentes concentraciones de nitrato de cadmio en condiciones de laboratorio

Accumulating capacity of cadmium in *Scirpus californicus* roots exposed to different concentrations of cadmium nitrate under laboratory conditions

Lili E. Fernández-Aguilar<sup>1</sup> y Santos Enrique Padilla<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tesista, Escuela AP de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo, Perú. <sup>2</sup>Departamento de Ciencias Biológicas. UNT

## RESUMEN

Se determinó la capacidad acumuladora de cadmio en raíces de *Scirpus californicus* en condiciones de laboratorio; para ello, luego de la aclimatación y adaptación del material experimental durante 30 días, se aplicó el diseño experimental de estímulo creciente con cinco tratamientos: 0; 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 ppm de cadmio, durante 15 días. La concentración de cadmio en las raíces se determinó mediante la técnica de Espectrofotometría de absorción atómica, cuyos datos se procesaron mediante Análisis de varianza y el método de Mínima Diferencia Significativa Honesta entre las muestras que presentaron diferencias significativas y para diferenciar los cambios de color y crecimiento se realizaron evaluaciones cualitativas tomando como referencia la Escala de Likert. Se encontró que las raíces del tratamiento con 1,5 y 2,0 ppm de cadmio acumularon mayor cantidad de este elemento, con cambios severos en el color, engrosamiento y crecimiento longitudinal. Se concluye que las raíces de *S. californicus* tienen capacidad de acumular, tolerar y resistir altas concentraciones de cadmio.

**Palabras clave:** Capacidad acumuladora, Cadmio, *Scirpus californicus*, espectrofotometría de absorción atómica.

## ABSTRACT

Storage capacity of cadmium in roots of *Scirpus californicus* under laboratory was determined. For this, after acclimatization and adaptation of the experimental material for 30 days, the increasing stimulus experimental design with five treatments: 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 ppm of cadmium, for 15 days were applied. The concentration of cadmium in the roots was determined by the technique of atomic absorption spectrophotometry, whose data were processed by analysis of variance and Least Significant Difference method Honest between samples that showed significant differences and to differentiate color changes and growth qualitative assessments were made by reference to the Likert Scale. It was found that treatment roots with 1.5 and 2.0 ppm of cadmium were the most quantity of this element accumulated, with severe changes in the color, thickness and longitudinal growth. It was concluded that the roots of *S. californicus* are capable of accumulating, tolerate and withstand high concentrations of cadmium.

**Keywords:** Accumulator capacity, Cadmium, *Scirpus californicus*, Atomic Absorption Spectrophotometry



## INTRODUCCIÓN

La fitorremediación, tecnología que utiliza a los vegetales para limpiar o disminuir los ambientes contaminados dentro de ellos el agua, constituye una estrategia interesante, debido a la capacidad que tienen algunas especies de absorber, acumular y/o tolerar altas concentraciones de contaminantes como metales pesados, compuestos orgánicos y radioactivos presentes en dichos ambientes. Dentro de esta tecnología se encuentran la fitoacumulación, que tiene la particularidad de absorber elementos químicos contaminantes mediante las raíces de las plantas y su acumulación en tallos y hojas, y la rizofiltración, que utiliza raíces de las plantas para absorber, precipitar y concentrar los contaminantes a partir de efluentes líquidos contaminados<sup>1,2,3</sup>.

Como una manera de descontaminar el medio acuático en el que habitan, esta característica de acumular o hiperacumular ha conducido a la utilización de plantas para la remoción de metales pesados mediante procesos de bioabsorción y bioacumulación, tal es el caso de: *Elodea* spp.<sup>4</sup>, *Eichornia crassipes*<sup>5</sup>; *Azolla pinnata*<sup>6</sup>, *Scirpus californicus*<sup>7</sup>, *Lemma giba*<sup>8</sup> y *Phragmites australis*<sup>9</sup>.

*Scirpus californicus* “totora”; es una especie herbácea, acuática emergente y cosmopolita, que crece de manera silvestre y cultivada en lagos y lagunas desde el nivel del mar hasta los 3000 metros de altitud en zonas pantanosas y zanjas ribereñas de Perú<sup>10</sup>; sus características anatómicas le permite mantener en su interior abundante agua y aire, en proporciones estables durante largos períodos de tiempo, por lo que fácilmente se propaga mediante yemas y semillas<sup>3,11,12</sup>.

La totora no solamente acumula contaminantes cuando está viva, sino que se ha verificado que los tejidos de ejemplares secos pueden ser altamente eficientes en la retención de metales, actuando como resinas de intercambio<sup>13,14</sup>. Esto se puede interpretar como que la utilización de biomasa seca sería una importante ventaja para el manejo de humedales construidos, porque las macrófitas podrían ser cosechadas, secadas y como disposición final, utilizadas en columnas para la eliminación de metales pesados en agua, debido a que cuando mueren, su degradación es lenta, pero siguen reteniendo metales dentro del humedal<sup>15</sup>.

Algunos estudios han revelado que el cadmio está asociado con el zinc y el fósforo, a manera de impureza, por lo que los fertilizantes cuya constitución química está basada en estos elementos pueden contener este metal, que se llega a convertir en contaminante y acumularse en los organismos vivos que ingieran material vegetal y, debido a su toxicidad, se encuentran sujetos a una de las legislaciones más severas en términos ambientales, porque en la vida acuática, puede incorporarse a los peces, a la vez a la cadena alimenticia y afectar a la salud humana cuyos efectos pueden ser agudos y crónicos<sup>16</sup>, por lo que resulta importante determinar estas concentraciones en los cuerpos de agua debido a sirven para regar diversos cultivos y vegetales silvestres los que serán consumidos por animales y seres humanos. En este contexto, la presente investigación que tiene como objetivo determinar la capacidad acumuladora de cadmio en raíces de *Scirpus californicus* “totora” expuesta a diferentes concentraciones de cadmio en solución a partir del nitrato de cadmio en condiciones de laboratorio.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Obtención de plantas de *S. californicus* en el laboratorio:

100 Plantas adultas de *S. californicus* se obtuvieron aleatoriamente dentro de una extensión de cinco Ha de los humedales de “Choc-Choc” (distrito de Moche, La Libertad-Perú), las que fueron trasladadas en baldes de 10 L de capacidad con agua de su medio hasta el laboratorio de Ecología y Medio Ambiente, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, para su aclimatación y adaptación en el laboratorio. El proceso de adaptación y aclimatación se realizó colocando a las plantas en recipientes de vidrio de 15 L de capacidad durante 30 días, haciendo cambio de agua potable en forma interdiaria con la finalidad de garantizar su viabilidad y desarrollo, con un fotoperiodo con luz permanente, haciendo uso de cuatro fluorescentes de 40 W, a fin de acercar a la similitud de iluminación de su medio natural, cuyas condiciones fueron demostradas cuando los ejemplares conservaron su color



verde oscuro y aspecto turgente. Para el estudio se utilizaron yemas de aproximadamente 5-7cm de longitud colocadas en vasos de vidrio de 150 mL.

### **Preparación de soluciones de cadmio**

Las concentraciones del material químico, se prepararon haciendo una solución patrón utilizando la sal de nitrato de cadmio tetrahidratado  $Cd(NO_3)_2 \cdot 4(H_2O)$  con la finalidad de hacer diluciones y disponerlos en el diseño experimental de estímulo creciente organizados en cinco tratamientos (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 ppm) y diez repeticiones teniendo una muestra testigo (control).

### **Tratamientos de las plántulas con soluciones de cadmio**

Las yemas de *S. californicus*, fueron sometidas a los tratamientos con soluciones de cadmio durante un período de 15 días, como se indica a continuación:

- 0.0 ppm ..... Tratamiento 1 (T1)
- 0.5 ppm ..... Tratamiento 2 (T2)
- 1.0 ppm. .... Tratamiento 3 (T3)
- 1.5 ppm ..... Tratamiento 4 (T4)
- 2.0 ppm ..... Tratamiento 5 (T5)

Las unidades experimentales para el diseño experimental, fueron elegidas completamente al azar, para los cinco tratamientos y 10 repeticiones; la unidad muestral consistió en cada recipientes (vasos de vidrio) con capacidad de 150 ml, cada una, de los cuales contenían la solución de cadmio (100 mL por recipiente) y una plántula por cada vaso, lo que nos permitió obtener la biomasa requerida para el análisis químico de las muestras. Cada recipiente fue acondicionado con una tapa de tecnopor donde estuvieron suspendidas las plántulas, las que fueron selladas con plástico adherente para evitar la contaminación con microorganismos, a la vez que se procedió a la oxigenación de cada recipiente, utilizando aeradores

### **Recolección de muestras:**

Transcurrido el tiempo previsto para la aplicación, en los tratamientos se seccionó cada una de las plántulas para separar las raíces de la parte aérea, las mismas que se enjuagaron con agua destilada y se secó con papel absorbente, se colocaron dentro de sobres de papel bond; los cuales fueron rotulados, indicando la parte de la plántula y la concentración de cadmio a la que habían sido sometidas en el diseño experimental las que fueron analizadas en el Laboratorio de Servicios a la Comunidad e Investigación (LASACI) de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Trujillo.

### **Observaciones y evaluaciones cualitativas de raíces:**

Se realizaron observaciones a las raíces de *S. californicus* de cada tratamiento durante el proceso experimental, para desarrollar las evaluaciones cualitativas de cambio de color y crecimiento, tomando como modelo la Escala de Likert; para ello se procedió a la construcción de una tabla donde presenta los ítems y criterios, los cuales disponen de puntuaciones del 1 al 5, con grado de desacuerdo y acuerdo, luego se realizó la suma de las puntuaciones de cada muestra y la correlación de cada ítem como se evidencia en el Anexo 9; para asegurar la precisión y fiabilidad de la escala, se desarrolló el criterio de consistencia interna, que consistió en seleccionar el 25 % de los muestras con puntuaciones máximas y el 25 % con puntuaciones mínimas; además de evaluar la diferencia de promedios para cada ítem; para la validez de la escala se escogieron los valores máximos de la diferencia de promedios y valores mayores a 0,20 para las correlaciones (Tabla 4) (Fernández 2005)

### **Cuantificación de cadmio en raíces de *Scirpus californicus***

La concentración de cadmio en las muestras se determinó utilizando un equipo de espectrofotometría de absorción atómica marca Perkin Elmer AAnalyst 300 HGA800 recomendado por Perkin Elmer Corporation (1996), tomando como referencia el método de calcinación y deshidratación de ácido clorhídrico al 10%, cuyos valores fueron almacenados registrados y ordenados como base de datos.

### **Análisis estadístico**

Los datos de acumulación de cadmio en las raíces de *S. californicus* analizados en el espectrofotómetro de absorción atómica, fueron procesados utilizando el análisis de varianza y el método de la Diferencia



Significativa Honesta propuesta por Tukey (1952) ( $p < 0.05$ ) para determinar las diferencias significativas entre tratamientos asignados, a través de los promedios. Para el Análisis de varianza se siguió el modelo

sugerido por Sokal y Rolf (1987). Para los análisis cualitativos de cambios de color y crecimiento de raíces de *S. californicus*, tomando como referencia la escala de Likert, los datos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS 19.

## RESULTADOS

Se encontró que a medida que aumenta la concentración de cadmio en los tratamientos (T) aumenta la concentración en las raíces de la plantas de *S. californicus*, con un máximo de 0,4432 en el T4 (2,0 ppm) y que, básicamente, no varían durante las repeticiones (Figs. 1, 2 y 3).

Cuando se evaluó el efecto del cadmio sobre el color de las raíces se observó que en le T1 no hubo cambios evidentes, que en los T2, T3 y T4 cambios moderados y en el T5 cambios severos que conllevaron a la muerte de la planta (Tabla 1); asimismo, dentro de los cambios radiculares (Tabla 2, Fig. 3) los más frecuentes fueron: crecimiento longitudinal (23%) y aparición de nuevas raíces (24%).

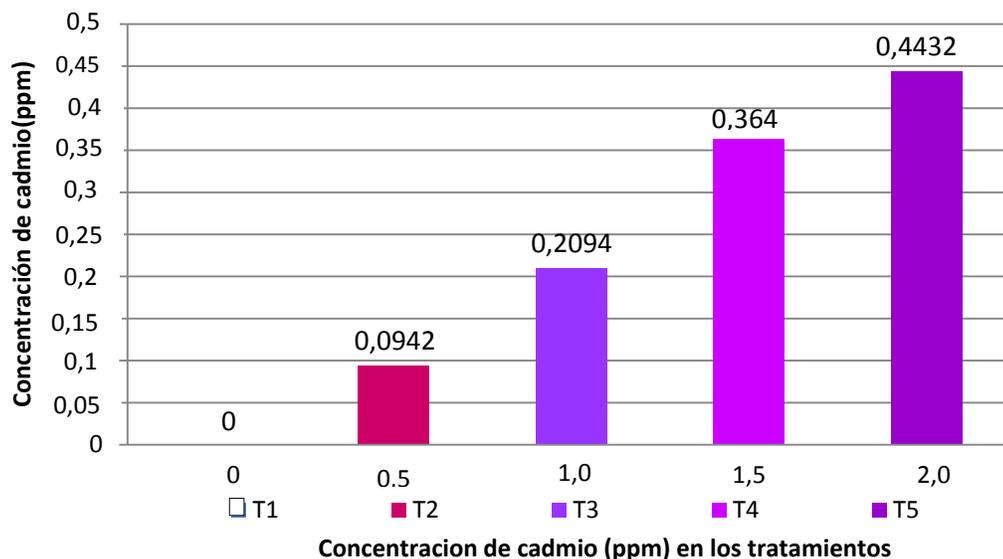


Fig. 1. Representación del promedio de la concentración de cadmio (ppm) en raíces de *Scirpus californicus* a los 15 días de tratamiento con diferentes concentraciones de cadmio.

Tabla 1. Cambio del estado de las raíces por el efecto de cadmio (ppm) en raíces de *Scirpus californicus*, después de 15 días de tratamiento.

	Efectos en los tratamientos	Cambio	Estado de raíz	Efecto
Color	T1	Blanco	ninguno	Ninguno
	T 3 y T4	Amarillo y marrón	leve	moderado
	T5	Negro	severo	Muerte
Crecimiento	T1, T2, T3, T4 y T5	Longitudinal	adelgazamiento	Aumenta
	T4 y T5	Engrosamiento	mayor volumen	Aumenta
	T3, T4 y T5	Pelos absorbentes	atrofia	ápice oscuro
	T1, T2, T3, T4 y T5	Nuevas raíces	atrofia	ápice oscuro

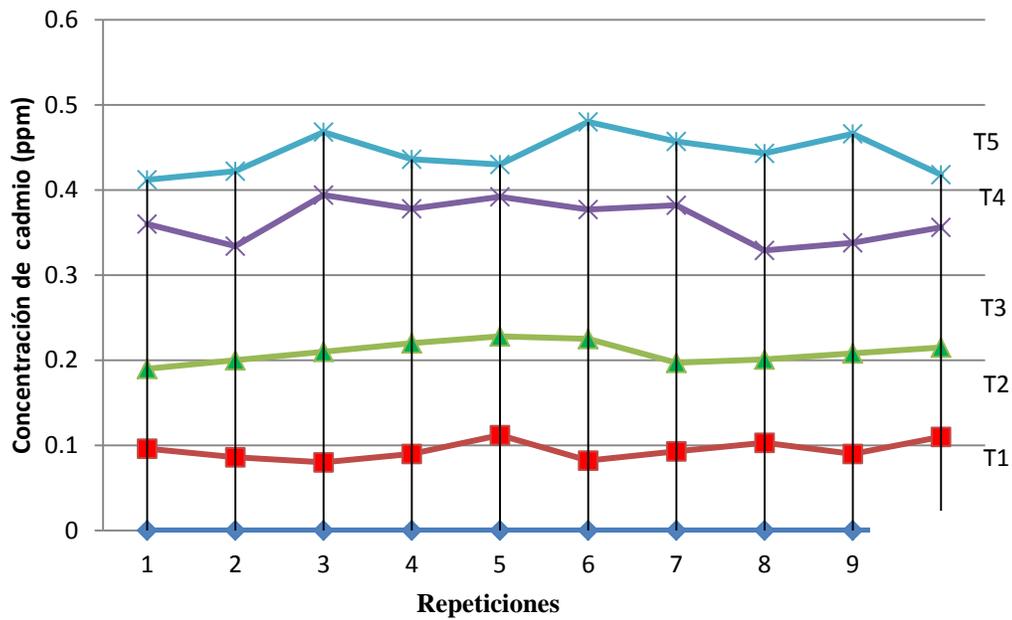


Fig. 2. Representación de la relación entre las repeticiones experimentales y la concentración de cadmio (ppm) en raíces de *Scirpus californicus* a los 15 días de tratamiento.

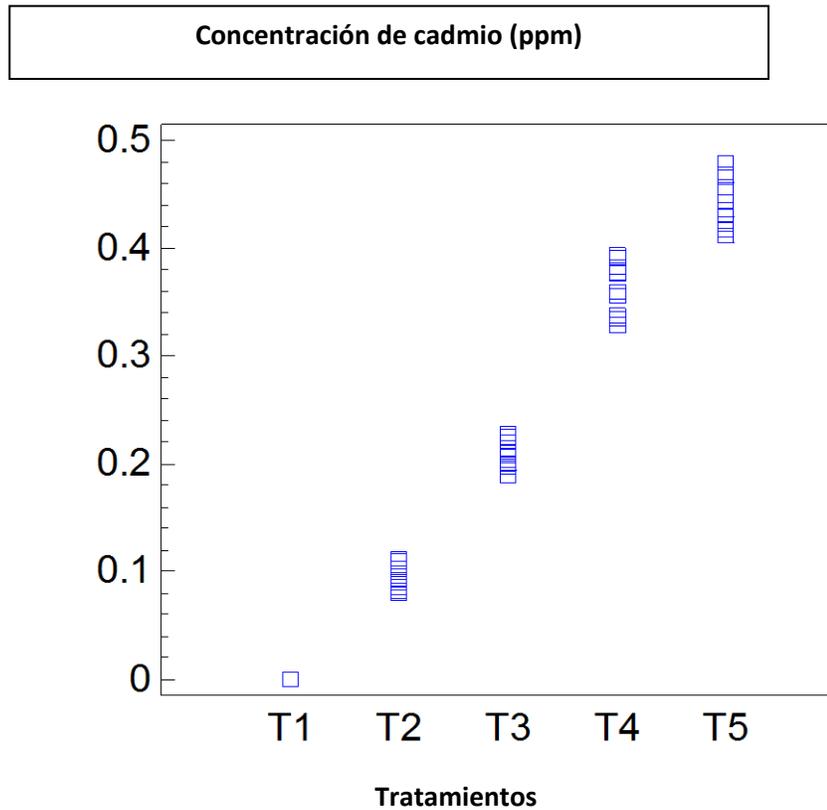
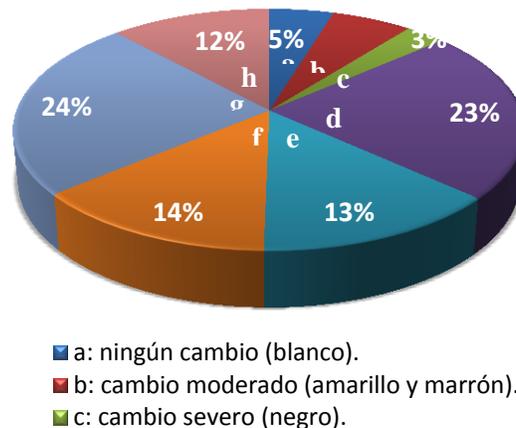


Fig. 3. Relación entre tratamientos y la concentración de cadmio (ppm), acumulado en raíces de *Scirpus californicus* a los 15 días de tratamiento.

**Tabla 2.** Valores en porcentajes de los diferentes cambios de color y crecimiento presentes en raíces *Scirpus californicus* después de 15 días de tratamiento.

	Cambio de color y crecimiento en raíces							
	a	b	c	d	e	f	g	h
Tratamiento 1	7	0	0	10	0	0	10	0
Tratamiento 2	1	4	0	10	0	0	10	0
Tratamiento 3	0	3	0	8	3	3	9	5
Tratamiento 4	0	3	0	5	10	10	9	6
Tratamiento 5	0	0	5	6	10	10	3	10
Σ	8	10	5	39	23	23	41	20
Porcentajes	5%	6%	3%	23%	13%	14%	24%	12%

**Leyenda:** En las letras indican el cambio de color y crecimiento de la raíz: **a:** sin cambio, (blanco). **b:** leve (crema y marrón). **c:** severo (negro). **d:** crecimiento longitudinal de raíz. **e:** engrosamiento de raíz. **f:** crecimiento de nuevos pelos absorbentes. **g:** aparición de nuevas raíces. **h:** aumento de biomasa radicular.



**Fig. 4.** Cambios de color y crecimiento presentes en raíces de *Scirpus californicus* después de 15 días de tratamiento de cadmio (ppm), expresados en porcentajes.

## DISCUSIÓN

Las especies vegetales como cualquier ser vivo, tiene la capacidad de absorber, adsorber o incluir dentro de su sistema inmunológico sustancias o elementos químicos de la naturaleza; muchos de ellos son beneficiosos para su subsistencia y otros perjudiciales para sus procesos fisiológicos, como es el caso de los elementos químicos, que participan en reacciones diversas hasta generar nuevas moléculas, que en muchos casos son acumuladas y producen cambios de color y forma de crecimiento<sup>17</sup>.

En esta experiencia se muestra valores encontrados en los tratamientos y repeticiones, los cuales aumentan en relación directa a la cantidad de cadmio (ppm) aplicado en cada tratamiento a *S. californicus*, que demuestra capacidad de asimilar el estímulo de dicho elemento; por lo que es de suponer que si se agrega mayor concentración, es posible que la planta tenga respuesta de tolerancia, cuyas evidencias se pueden contrastar con la investigación de Contreras<sup>7</sup>, quien afirma que la mayor



concentración de cadmio se encontró en la raíz de *S. californicus*; en condiciones naturales a campo abierto; similares estudios han reportado que la misma especie acumula plomo, cobre, cromo, níquel y arsénico, en las mismas condiciones<sup>18</sup>. Asimismo, la tendencia ascendente en concordancia con las concentraciones aplicadas permite asumir que la planta posiblemente tiene la capacidad de tolerar concentraciones mayores a 2 ppm; por lo tanto, podemos sospechar que en nuevas experiencias encontraremos valores superiores a los encontrados.

Durante el proceso experimental, se utilizaron diez repeticiones distribuidas en el espacio disponible en condiciones similares como se demuestra en la figura 3; con la intención de que no haya interferencia durante el tratamiento, como se observa la secuencia de valores casi homogéneos en los tratamientos uno (T1), dos (T2) y tres (T3) a diferencia del tratamiento cuatro (T4) y cinco (T5); aunque el incremento en la repetición 5 del tratamiento 2 (T2), se debe posiblemente al aumento de raíces en la planta como se observa con la misma tendencia en los tratamiento tres (T3) en las repeticiones 4, 5 y 6; similares al tratamiento cuatro (T4) y cinco (T5), donde presentan variaciones en las repeticiones 3, 6 y 9; lo que permite asumir que la planta tiene tendencia a sufrir perturbaciones, evidenciadas por los cambios de color y crecimiento en la raíz, concordante con los reportes anteriores que refirieron que el estrés por metales pesados puede inducir un engrosamiento de las raíces, incluyendo un incremento en la densidad y diámetro de las mismas, cuya condición favorece la capacidad de acumular mayor cantidad del elemento químico<sup>19,20</sup>.

El análisis de varianza demostró que los datos obtenidos tiene confiabilidad, lo que permite demostrar diferencia significativa desde el punto de vista estadístico entre tratamientos, confirmado con el valor Fisher (F) calculado que es mayor que Fisher (F) tabulado; sin embargo, el valor que corresponde las repeticiones, F-calculado es menor que F-tabulado; lo que significa que no hay diferencia entre las repeticiones; es decir que cada una de las unidades experimentales están dispuestas en las mismas condiciones, lo que se confirma con la representación de la figura 4; que explica por la separación de cada cuadrícula; lo que da evidencias que las repeticiones del tratamiento cuatro (T4) tienen mayor variación; posiblemente tenga relación con el estado de estrés de la planta, concordante con lo señalado previamente: las plantas cuando acumulan el cadmio en las raíces y en los tallos, inhiben su desarrollo y crecimiento de la parte radical, debido a que este elemento, por su toxicidad, causa inhibición del crecimiento de la raíz, por lo que probablemente la planta acumule menos cantidad de cadmio<sup>21,22</sup>.

La comparación de los tratamientos presentados en la tabla 3, tiene especial énfasis; puesto que indica que los tratamientos tienen diferencia significativa; esto significa que la acumulación de cadmio (ppm) en las raíces de la planta no es la misma, apreciándose que es menor en el tratamiento 2 (T2) y va aumentando hasta el tratamiento 5 (T5); es decir que el efecto en las raíces será más severo a medida que aumenta las concentraciones de exposición<sup>23</sup>.

Con la finalidad de conocer, la respuesta de la planta al estímulo de cadmio, se hacen evaluaciones cualitativas, tomando como modelo la escala de Likert; donde se evidencian los efectos de cadmio producidos en las raíces de *S. californicus* expresados en los cambios en el color y crecimiento de la raíz, tomando como referencia el criterio de consistencia interna, donde se puede afirmar que la diferencia de promedios es buen indicador de las evaluaciones, realizadas durante la experimentación; así mismo los resultados de la correlación concuerdan con las evaluaciones de fiabilidad y validez de la escala, que explica que los valores deben ser mayores a 0,20.

Del mismo modo en la tabla 7 y figura 5, están reportando los porcentajes de unidades experimentales con cambios de color y crecimiento de las raíces de *S. californicus*; se observa que el 24% de las plantas, las raíces presentan un aumento en la aparición de nuevas raíces, con mayor evidencia en los tratamientos 1, 2 y 3; puesto que la cantidad de cadmio (ppm) es menor, a diferencia de los tratamientos 4 y 5, el 23% y 13% de las raíces de las plantas, presentan un aumento en la longitud radicular y un aumento en el grosor del diámetro de las raíces; debido a que estuvieron sometidas a diferentes concentraciones de cadmio y siguieron aumentando su crecimiento, como se indica en los anexos 11, 12, 13 y 14; estos resultados son contrastantes con los reportes de Wang y Zhou<sup>24</sup>.



## CONCLUSIONES

- *Scirpus californicus* tiene capacidad de acumular altas concentraciones de cadmio de 0,4432 ppm, correspondiente al tratamiento 5.
- *Scirpus californicus* tiene capacidad de tolerar y sobrevivir altas concentraciones de cadmio.
- El cadmio produce cambios de color y crecimiento en raíces de *Scirpus californicus*

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arias M, Betancur T, Gomez R, Salazar G, et al. Fitorremediación con humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales porcinas. Informador técnico 2010; 74: 12-22.
2. Jaramillo J, Flores C. Fitorremediación mediante el uso de dos especies vegetales *Lemna minor* (Lenteja de agua), y *Eichornia crassipes* (Jacinto de agua) en agua residuales producto de la actividad minera. Tesis de Ingeniero Ambiental. Universidad Politécnica Salesiana. Colombia. 2012.
3. Benítez P. Evaluación de la distribución de metales pesados en las plantas acuáticas Jacinto de agua (*Eichornia crassipes*) y Tul (*Thypha spp*) utilizadas en la planta de tratamiento de aguas residuales la Cerra, Villa Canales por medio de fluorescencia de Rayos X. Tesis de Maestro en Ciencias en Ciencia y Tecnología del Medio Ambiente. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2008.
4. Hauenstein E, Ramírez C, González M, Leiva L, et al. Flora hidrófila del Lago Villarrica (IX Región, Chile) y su importancia como elemento indicador de contaminación. Rev Medio Ambiente 1996; 13 (1): 88-96.
5. Karpiscak M, Foster K, Hope S, Warshall P. Using water hyacinth *Eichornia crassipens* to treat wastewater. Arid Lands Newsletter 1992; 32: 6-12.
6. Jain S, Valsudevan P, Jha N. *Azolla pinnata* R Br. and *Lemna minor* for Removal of lead and Cadmium from Polluted Water. Wat. Res. 1990; 24 (2):177-183.
7. Contreras S. Determinación de metales traza (Ni, Cr, Cd, Fe, Mg, Al) en totora (*Scirpus californicus*) y sedimento en el santuario de la naturaleza Carlos Anwandter, río Cruces, Valdivia. Tesis de Químico Farmacéutico de la Universidad Austral de Chile. 2006.
8. Boniardi N, Rota R, Nano G. Effect of dissolved metals on the organic load removal efficiency of *Lemna gibba*. Water Res 1999; 33(2): 530-538.
9. Ye Z, Baker A, Wong M, Willis A. Zinc, lead and cadmium tolerance, uptake and accumulation by the common reed *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. Ann Bot 1997; 80(3): 363-370.
10. Burke D, Weis J, Weis P. Release of metals by the leaves of the salt marsh grasses *Spartina alterniflora* and *Phragmites australis*. Estuarine, Coastal and Shelf Science 2000; 51: 153-159.
11. Mostacero, L., Mejía, C. y Gamarra, T. 2009. Fanerógamas del Perú: Taxonomía, Utilidad y Ecografía. Edita CONCYTEC. Primera edición. Pág. 1068.
12. Velasco G, Espinosa E. Evaluación de la fitorremediación en términos de remediación de carga orgánica, tratando aguas residuales contaminadas con hidrocarburos. Tesis de Tecnólogo en Química en la Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia. 2010.
13. Abdel G, Hegazy A, Chaghaby G, Lima E. Factorial experimental design for biosorption of iron and zinc using *Typha domingensis* phytomass. Desalination 2009; 249: 343-347.
14. Verma V, Tewari S, Rai J. Ion exchange during heavy metal biosorption from aqueous solution by dried biomass of macrophytes. Biores Technol 2008; 99: 1932-1938.
15. Hammerly J, Leguizamon M, Maine M, Schiver D, Pizarro M. Decomposition rate of plant material in the Parana Medio River (Argentina) 1989; 183(3): 179-184.
16. Lora R. Contaminación por micronutrientes y posibles soluciones. Rev. U.D.C.A. Act & Div Cient 2007; 7(1): 5-20.
17. Salisbury B, Roos W. Fisiología de las Plantas. 3ra ed. México: Edit. Ibo América. 1994.
18. Figueroa C. Determinación de metales trazas (Ni, Cr, Cu y As) en *Scirpus californicus*. Tesis de Químico Farmacéutico. Universidad Austral de Chile. 2004.
19. Arduini I, Masoni A, Mariotti M, Ercoli L. Low cadmium application increase miscanthus growth and cadmium translocation. Environ Exp Bot 2004; 52:153-164.



20. Rucinska R, Waplak S, Gwozdz E. Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. *Plant Physiol Biochem* 1999; 37: 187-194.
21. Varvara P. Increase ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb and Zn. Department of biology. University of Waterloo. Ontario, Canadá. N2 L 3G1. 2001.
22. Williams L, Pittman J, Hall J. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochim et Biophys Acta* 2000; 1465: 104-126.
23. Xie Y, Yu D. The significance of lateral roots in phosphorus acquisition of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Rev Aquat Bot* 2003; 75: 311-321.
24. Wang X, Zhou Q. Ecotoxicological effects of cadmium on three ornamental plants. *Chemosphere* 2005; 60: 16-21.



# Determinación del Fenómeno L.E. (Lupus eritematoso) por efecto de la aplicación del Procainamida (Biocoryl®) en *Cavia porcellus* (cobayo)

Determination of L.E. (Lupus Erythematosus) phenomenon by effect of the application of Procainamide (Biocoryl®) in *Cavia porcellus* (guinea pig)

César Cabrejos M., Katherine Ipanaqué M. y Carlos Espinoza V.

Departamento Académico de Microbiología, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.  
esvac2006@hotmail.com

## RESUMEN

Procainamide es un efectivo agente antirrítmico que cuando se usa indiscriminadamente induce a la presentación de lupus eritematoso sistémico (LES), sin embargo, no se cuenta con un modelo animal que permita investigar las causas del fenómeno. En el presente estudio se determinó el fenómeno LE en cobayos, *Cavia porcellus*, machos, inducido por la inyección de una dosis promedio de 0,35 mg de Procainamide (Biocoryl®). Los resultados demostraron que las muestras experimentales en el pre-basal presentaron polimorfonucleares normales, mientras que los análisis post inoculación del fármaco mostraron que el 80% mostraron el fenómeno LE, del siguiente modo: dos de ellos en siete días, tres a los 14 días, tres a los 21 días, tres a los 28 días, ocho a los 35 días, tres a los 42 días y dos a los 63 días. Se concluye que el uso de cobayo en la producción experimental del fenómeno LE da buenos resultados.

**Palabras clave:** Fenómeno LE, *Cavia porcellus*, modelo animal, Procainamida.

## ABSTRACT

Procainamide is an effective antirhythmic agent when was used indiscriminately induces systemic lupus erythematosus (SLE) presenting, however, there is no animal model with which to investigate the causes of the phenomenon. In the present study, the phenomenon in male guinea pigs LE, *Cavia porcellus*, induced by the injection of an average dose of 0.35 mg Procainamide (Biocoryl®). The results demonstrated that the experimental samples showed basal normal polymorphonuclear while post inoculation drug analysis showed that 80% showed the phenomenon LE, as follows: two in seven days, three at 14 days three at 21 days, three at 28 days, eight to 35 days, three at 42 days and two at 63 days. It was concluded that the use of guinea pigs in experimental production of LE phenomenon gives good results.

**Keywords:** LE Phenomenon, *Cavia porcellus*, animal model, Procainamide



## INTRODUCCIÓN

El lupus eritematoso (LE) es una enfermedad autoinmune asociada con inflamación multisistémica; el concepto nosográfico incluye a tres principales tipos: LE cutánea crónica, LE cutánea subaguda y LE sistémica, que puede ser inducida por drogas. En efecto, muchos medicamentos indicados para el tratamiento de enfermedades tales como, Procainamida utilizado para problemas cardiacos, Estreptomycin e Isoniazida para casos de la tuberculosis, Methyldopa e Hidralazina como antihipertensivos y Penicilina y/o Tetraciclina para infecciones bacterianas (bronquitis, neumonía) producen efectos perjudiciales en aquellas personas que las utilizan en forma prolongada<sup>1,2,3,4</sup>.

Desarrollado hace más de 40 años, Procainamida es un efectivo agente antiarrítmico tipo I, que es usado para tratar una variedad de disrritmias atriales y ventriculares, debido a que se absorbe rápidamente en el cuerpo, con niveles máximos en el plasma entre los 15 y 60 minutos luego de la administración intravenosa, obteniendo una vida media plasmática de 1 a 2 horas y una biodisponibilidad de alrededor del 75%. Su aplicación es limitada, como se ha señalado, debido a que entre el 25 y 30% de usuarios desarrolla LE<sup>3,4,5</sup>.

Por su parte, el denominado fenómeno LE consiste en la presencia de neutrófilos maduros (a veces un monocitos o eosinófilos) que han fagocitado material nuclear alterado procedentes de otros leucocitos y muestran sus núcleos desplazados hacia la periferia<sup>1,2</sup> y es una de las maneras más apropiadas de relacionar su presencia con la enfermedad autoinmune, porque su ausencia la descarta en definitiva<sup>6,7,8</sup>.

Considerando que procainamida continua siendo usada, pues se expende en algunas farmacias y muchas veces son donados por algunos países a entidades religiosas, los cuales son obsequiados a personas de bajos recursos y que no se cuenta con un modelo animal para su estudio, porque el modelo murino, usado en distintas enfermedades autoinmunes no ha permitido reproducir el fenómeno LE como se esperaba<sup>8</sup>, es necesario contar con una alternativa que permita comprender la naturaleza de esta dolencia. En tal sentido, se propuso una investigación dirigida a lograr reproducir experimentalmente el fenómeno LE en el modelo cobayo, *Cavia porcellus*, utilizado procainamida así como determinar el tiempo en que aparece.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### El fármaco y los animales de experimentación

Procainamida (Biocoryl®) se adquirió de un lote de donaciones del medicamento a una congregación cirtiana de Chiclayo dirigida por religiosas; asimismo, se obtuvieron 30 cobayos machos (*C. porcellus*) de 750-850 gramos aproximadamente que se mantuvieron en condiciones controladas en el Bioterio del Área de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (U.N.P.R.G.) de acuerdo con la Declaración universal de los derechos de los animales (UNESCO 1989) y a la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio<sup>10</sup>, no considerándose tamaño de muestra sino sólo unidades experimentales que está fundamentado por el diseño de tipo clásico simple<sup>9,12</sup>. Este diseño se trabajó con un sólo grupo de animales de experimentación de 30 cobayos, de los cuales se les realizó mediciones antes y después<sup>9</sup>.

### Determinación del fenómeno LE

Para la determinación del fenómeno L.E. basales y post – inoculaciones con el fármaco en *C. porcellus* (cobayo) se obtuvieron por punción cardiaca 5 ml de sangre total, las cuales fueron sometidas al método de desfibrinación. Este método consistió en colocar la sangre total en un frasco de 50 ml conteniendo 30 perlas de vidrio de 3 mm de diámetro y agitando cuidadosamente describiendo ochos durante 15 minutos, hasta que la fibrina se haya separado. Se retiró la fibrina pegada a las perlas de vidrio y se transfirió a un tubo de ensayo estéril, posteriormente se centrifugó hasta que se forme la capa leucocitaria. Se incubó a 37°C en estufa durante 2 horas, para luego extraer gotas de la capa leucocitaria, hacer el frotis respectivo y aplicar la técnica de coloración de Giemsa<sup>11,14</sup>.

Para este estudio la administración del Procainamida (Biocoryl®) a los animales de experimentación fue la vía oral, y se trabajó con comprimidos de 25 mg que fueron triturados en un mortero. La adecuación

del fármaco se basó teniendo en cuenta que: si para una persona de 60 kilos le corresponde una dosis de 25 mg del Procainamida, entonces para un cobayo de 850 gramos serían 0,35 mg del fármaco. Por lo tanto, los 25 mg triturados fueron vertidos en un tubo de ensayo conteniendo 10 ml de solución salina fisiológica estéril obteniendo así 2,5 mg del fármaco. En otro tubo estéril se colocó 9 ml de la solución salina fisiológica estéril con 1 ml de la mezcla anterior, obteniéndose un total de 10 ml y diluyéndose el medicamento hasta 0,25 mg/ml. Entonces si 0,25 mg está contenido en 1 ml, para 0,35 mg resultó 1,4 ml. Bajo esta secuencia las dosis trabajadas en las 30 muestras experimentales fue un promedio de 0,35 mg/1,4 ml de acuerdo al peso corporal de cada cobayo. La técnica de Giemsa se hizo mediante el esquema propuesto en el Manual de Procedimientos de Laboratorio de la INS<sup>11</sup>.

Las características con valor diagnóstico del fenómeno L.E. (positivo) fue la aparición de diferentes coloraciones de los núcleos amorfos (púrpura, azul y hialina), así como, la presencia de 2 – 4 cuerpos de inclusión en un PMN desplazando el núcleo propio del neutrófilo<sup>17</sup>.

Los datos obtenidos fueron presentados en tablas de frecuencia con sus respectivos porcentajes y se realizaron con el propósito de facilitar su análisis referido al tiempo de aparición del fenómeno L.E. en *C. porcellus* por aplicación del Procainamida.

## RESULTADOS

Los 30 cobayos resultaron negativos al fenómeno LE basal (previo al uso del fármaco) y los polimorfonucleares fueron observados con sus características normales

Se encontró que el 80% (24 de 30) de los especímenes presentaron el fenómeno L.E. y un 20% (6 de 30) no lo presentaron y que éste apareció mayormente entre los 30 y 90 días (Fig. 1 Tabla 1)

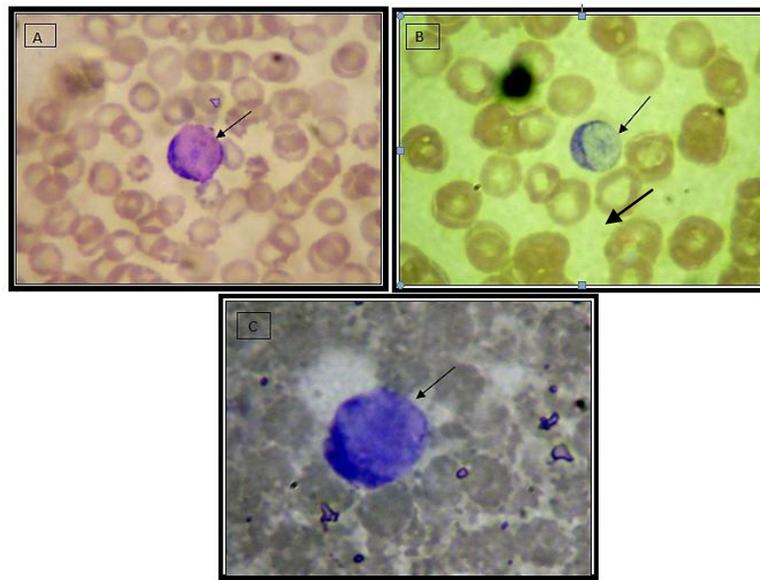


Fig. 1. Polimorfonucleares (PMN) –flechas- mostrando inclusiones intracitoplasmáticas amorfas con: A, núcleo púrpura; B, núcleo hialino; y C, núcleo azul.

## DISCUSIÓN

Como ha sido establecido, el fenómeno LE puede ser transferido, así ocurrió cuando se transfundió 90 mL de plasma de enfermos con lupus eritematoso diseminado a cuatro perros y pudo encontrarse en su sangre dicho fenómeno, en 30 minutos, 4 horas, 6 horas y 2 días<sup>8</sup>. Si bien es cierto, en la presente investigación no se hizo lo mismo, resulta importante considerar como parte del análisis comparar el tiempo en que aparece el fenómeno, observándose claras diferencias, porque en la presente investigación



se encontró tiempos mayores, de hasta 63 días. Esto podría deberse a la cantidad de inóculo utilizado, el tipo de antígeno con la cual se trabajó y la vía de inoculación.

Si bien es cierto la documentación es amplia respecto del fenómeno en estudio, conociendo como anticuerpos antinucleares para referirse a su presentación, ya que ha sido asociada a diferentes patologías

y hay una clara división nosológica<sup>6,18</sup> y su asociación con el uso de la procainamide también está claramente definida<sup>3,4,15,16</sup>, los trabajos en modelos animales no son muy amplio, por lo que resulta de importancia determinar cuál de ellos permitiría un mejor estudio para descubrir las causas del fenómeno. En este sentido, los resultados de la presente investigación demuestran que el modelo usado da buenos resultados.

**Tabla 1.** Tiempo de aparición en semanas del Fenómeno L.E. post-inoculaciones con Procainamida (Biocoryl®) en especimens de *Cavia porcellus* (cobayo).

TIEMPO DE LECTURA (DÍAS)	N° DE COBAYOS POST-INOCULACIÓN FENÓMENO L.E.						TOTAL N° COBAYOS	
	N° Muestras Experimentales (Cp: <i>Cavia porcellus</i> )	POSITIVO		N° Muestras Experimentales (Cp: <i>Cavia porcellus</i> )	NEGATIVO		n°	%
		n°	%		n°	%		
0 - 7	Cp1, Cp3	2	6.6	Cp2, Cp4 - Cp30	28	93.34	30	100
8 - 14	Cp2, Cp4, Cp6	3	10	Cp5, Cp7 - Cp30	25	83.34		
15 - 21	Cp7, Cp10, Cp12	3	10	Cp5, Cp8, Cp9, Cp11, Cp13 - Cp30	22	73.34		
22 - 28	Cp5, Cp8, Cp9	3	10	Cp11, Cp13 - Cp30	19	63.34		
29 - 35	Cp11, Cp13 - Cp19	8	26.66	Cp20 - Cp30	11	36.68		
36 - 42	Cp21, Cp23, Cp24	3	10	Cp20, Cp22, Cp25 - Cp30	8	26.68		
43 - 49	-	0	-	Cp20, Cp22, Cp25 - Cp30	8	-		
50 - 56	-	0	-	Cp20, Cp22, Cp25 - Cp30	8	-		
57 - 63	Cp25, Cp30	2	6.66	Cp20, Cp22, Cp26 - Cp29	6	20		
64 - 70	-	0	-	Cp20, Cp22, Cp26 - Cp29	6	-		
71 - 77	-	0	-	Cp20, Cp22, Cp26 - Cp29	6	-		
78 - 84	-	0	-	Cp20, Cp22, Cp26 - Cp29	6	-		
85 - 91	-	0	-	Cp20, Cp22, Cp26 - Cp29	6	-		
<b>TOTAL</b>		24	80		6	20	30	100

Al mismo tiempo, los resultados de la presente investigación demuestran que el fenómeno LE puede reproducirse en el laboratorio, porque resulta de importancia para definir: la vía de inoculación, el tipo de antígeno, el tiempo de aparición del fenómeno, las consecuencias en los diferentes órganos internos, etc, se puede en trabajos futuros considerar algunos otros aspectos igualmente importantes. Por ejemplo, si en la población humana dicho fenómeno está claramente influenciado por la etnicidad<sup>19</sup>, podría probarse el fenómeno en diferentes razas de cobayo, claro, siempre considerando que los modelos animales solo dan una pauta general de lo que ocurre y no necesariamente indican con exactitud que el fenómeno ocurrirá igual en lapoblación humana<sup>20</sup>.

## CONCLUSIONES

- El fenómeno L.E. inducido por 0,35 mg de Procainamida en cobayo, *Cavia porcellus*, apareció entre siete y 63 días, con una mayor frecuencia (26%) a los 35 días
- El 80% de los cobayos presentaron fenómeno L.E. positivo lo que sugiere que este es un apropiado modelo animal para el caso.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Connor B. The L.E. Cell Phenomenon. En: A color atlas and instruction manual of peripheral blood cell morphology. (Connor, ed), USA: Williams & Wilkins Edit, 1984; pp.283-291
2. Ogryzlo M. The L.E. (Lupus erythematosus) Cell Reaction. M A J 1956; 75: 980-991.
3. Li F, Patterson AD, Krausz KW, Dick B, et al. Metabolimics reveals the metabolic map of procainamide in humans and mice. *Biochem Pharmacol* 2012; 83: 1435-1444
4. Schoomn WM, Thomas SL, Somers EC, Smeeth L, et al. Do selected drugs increase the risk of lupus? A matched case control Study. *Br J Clin Pharmacol* 2010; 70(4): 588-596
5. Liu Ch-Ch, Kao AH, Manzi S, Ahearn JM. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: challenges and prospects for the future. *Ther Adv Musculoskeletal Dis* 2013; 5(4): 210-233
6. Maichof W, Hilas O. Lupus: An overview of the disease and management options. *P&T* 2012; 37(4): 140-148
7. Bencze G. Production of Lupus Erythematosus (L.E.) cells in the dog by the transfusión of systemic lupus erythematosus plasma. *Ann Rheum Dis* 1959; 19: 48.
8. Benze G. Experimental Transfusion in rabbits, guinea-pigs, rats, and mice of systemic lupus erythematosus plasma. *Ann Rheum Dis* 1962; 21: 76
9. Campbell D, Stanley J. Tres diseños experimentales propiamente dichos. En: Diseños experimentales y cuasi-experimentales en la investigación social. (Campbell, ed). Argentina: Edit. Amorrortu. 1973; pp.1-3.
10. Centro Nacional de Productos Biológicos. Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Instituto Nacional de Salud, Lima. Perú. 2008.
11. Centro Nacional de Salud Pública. Manual de Procedimientos de Laboratorio. Instituto Nacional de Salud, Lima. Perú. 2003.
12. Dawson B, Trapp R. Bioestadística médica. 2da ed. México: Edit. El Manual Moderno. 1999.
13. Kaplan J. Lupus like illness precipitated by procainamide hydrochloride. *J Amer Med Ass* 1965; 192: 444.
14. Lynch M. Métodos de Laboratorio. 2da. Ed. México: Edit. Interamericana S.A. 1972).
15. Pigeon G, Genest J. Prolonged Hydralazine Hydrochloride administration in 132 hypertensive patients study of toxicity. *M A J* 1960; 83: 743-746
16. Swarbrick E, Gray I. Systemic lupus erythematosus during treatment with Procainamide. *British Heart J* 1972; 34: 284-288.
17. Levo Y, Pick AI, Avidor I, Ben-Bassat M. Clinicopathological study of a patient with procainamide-induced systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1976; 35: 181-185
18. Nikpour M, Gladman DD, Urowitz MB. Premature coronary heart disease in systemic lupus erythematosus: what risk factors do we understand? *Lupus* 2013; 22: 1243-1250
19. Gonzales LA, Toloza SMA, McGwin Jr G, Alarcón GS. Ethnicity in systemic lupus erythematosus (SLE): its influence on susceptibility and outcomes. *Lupus* 2013; 22: 1214-1224
20. Greek R, Rice MJ. Animal models and conserved processes. *Theor Biol Med Model* 2012; 9: 40



# Sensibilidad antibacteriana de cultivos de *Listeria* sp. aislados de lugares de expendio de pollo y quesos en mercados de la ciudad de Trujillo (Perú)

## Antibacterial sensitivity *Listeria* sp. cultures isolated from chicken and cheeses outlay in Trujillo (Peru) markets

J. Vega<sup>1</sup>, P. Mercado <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tesista de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología. <sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

### RESUMEN

La listeriosis es una enfermedad transmitida por los alimentos y de curso grave si no se establece el diagnóstico oportuno y el tratamiento temprano. El agente etiológico, *Listeria*, se encuentra ampliamente distribuida y puede sobrevivir prolongados periodos de tiempo en distintos medios. En la presente investigación se determinó la sensibilidad antibacteriana de siete cultivos de *L. monocytogenes*, 17 cultivos de *L. innocua* y 13 cultivos de *L. ivanovii* frente a once antibióticos: B-Lactámicos (Penicilina y Ampicilina), Eritromicina, Cotrimoxazol, Ac. Nalidixico, Ciprofloxacina, Gentamicina, Vancomicina, Cloranfenicol, Rifampicina y Tetraciclina; para ello, los cultivos se reactivaron en agar nutritivo, se suspendieron comparados con el patrón de turbidez McFarland 0,5 (equivalente a 10<sup>8</sup> UFC/ml) y se estriaron en placas con Agar Mueller-Hinton en varias direcciones en donde se colocaron los discos de sensibilidad. La incubación se hizo por 48 hs. Se concluye que existe mayor frecuencia de sensibilidad frente a los antibacterianos usados en los cultivos de *Listeria monocytogenes* y *L. innocua*.

**Palabras clave:** Antibiograma, antibacterianos, Muller-Hinton, *Listeria*

### ABSTRACT

Listeriosis is a foodborne disease and severe course if not set early diagnosis and early treatment. The etiologic agent, *Listeria*, is widely distributed and can survive long periods of time in different media. In this study we investigated the antibacterial sensitivity of seven crops of *L. monocytogenes* cultures L. 17 innocua and L. crops 13 ivanovii compared to eleven antibiotics: B - lactam (penicillin and ampicillin), erythromycin, cotrimoxazole, Ac. Nalidixic, ciprofloxacin, gentamicin, vancomycin, chloramphenicol, rifampicin and tetracycline, for this, the cultures were reactivated on nutrient agar, suspended compared to 0.5 McFarland turbidity standard (equivalent to 10<sup>8</sup> CFU / ml) and streaked on plates with Mueller -Hinton Agar in several directions in which discs were placed sensitivity. Incubation was for 48 hours. It was concluded that there is a greater frequency of sensitivity to antibacterials used in crops *Listeria monocytogenes* and *L. innocua*.

**Key words:** Susceptibility, antibacterial, Muller-Hinton, *Listeria monocytogenes*



## INTRODUCCIÓN

*Listeria monocytogenes*, microorganismo que causa la listeriosis, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza: suelos, aguas residuales, comida animal y vegetal, productos lácteos sin pasteurizar, desechos de mataderos, así como en el tracto digestivo de humanos y animales asintomáticos<sup>1,2</sup>. Es un bacilo Gram positivo, que crece a temperaturas que varían entre 1 y 45°C, a pH de 4,4 a 9,6, en concentraciones altas de cloruro de sodio (15 %) y es capaz de formar biopelículas para protegerse de la acción de los antibacterianos<sup>3,4</sup>.

El género *Listeria* actualmente comprende seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi*. De ellas, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son potencialmente patógenas para el hombre y animales y la enfermedad que ocasionan se conoce con el nombre de listeriosis y la primera se halla registrada como un patógeno oportunista, con tasas de mortalidad del 20-30%. Todas las cepas de *L. monocytogenes* se consideran patógenas, aunque su virulencia es variable<sup>5</sup>.

La experiencia en la industria de la carne de aves señala que se ha formado un nicho en la línea de producción. Los nichos son sitios dentro del ambiente de la producción en el cual se instala la bacteria y se multiplica (Biofilms). Así, estos sitios se transforman en reservorios desde donde se contaminan los alimentos. Durante las operaciones regulares de limpieza estos sitios pueden ser difíciles de encontrar y consecuentemente limpiar<sup>6</sup>. Aunque *L. monocytogenes* se ha considerado durante muchos años un patógeno de animales, su papel significativo como patógeno humano transmitido por alimentos se hizo evidente a partir de 1980, cuando aparece con cada vez más frecuencia informes de brotes de listeriosis originados por consumo de alimentos contaminados, principalmente leche cruda o procesada<sup>7,8</sup>.

Factores como las prácticas de ordeño, las condiciones de infraestructura, la higiene en las salas y equipos de la granja pueden contribuir a la presencia de *Listeria* sp. , en la leche y en sus derivados; varios métodos de detección han demostrado que la contaminación del producto final proviene a menudo del ambiente, incluyendo suelo, paja y materia fecal, tanto en la leche como en los quesos<sup>8</sup>. Por lo tanto, la listeriosis debe ser considerada dentro del grupo de las infecciones alimentarias donde la *L. monocytogenes* es una de los agentes responsables y se ha presentado con tasas de mortalidad entre 20 y 30%, las más altas de todas ellas<sup>9</sup>.

Una característica importante de la listeriosis transmitida por alimentos es que el patógeno puede multiplicarse a temperaturas de refrigeración hasta alcanzar cifras significativas si transcurre suficiente tiempo. Esta bacteria se refugia en áreas específicas donde se hallan residuos de alimentos y agua con temperaturas ideales y que usualmente son difíciles de limpiar y desinfectar; brindando una ubicación ideal para que *L. monocytogenes* sobreviva, se multiplique y potencialmente contamine los alimentos<sup>10</sup>. La frecuencia de brotes asociados al consumo de leche cruda o sus derivados ha puesto de manifiesto la importancia de evaluar las condiciones de ordeño, transporte y procesamiento de la leche<sup>11</sup>.

La presentación clínica de la listeriosis incluye dos formas: listeriosis perinatal y listeriosis en el paciente adulto (99%), de preferencia en el inmunodeficiente. En ambas, las formas clínicas predominantes corresponden a infección local diseminada o infección local en el sistema nervioso central (SNC); sin embargo, a pesar que tiene alto porcentaje de mortalidad (20 a 30%) la dosis mínima requerida de *L. monocytogenes* para causar infección clínica en humanos no ha sido determinada, aunque el gran número detectado en los alimentos responsabilizados de casos esporádicos y epidémicos de listeriosis (10<sup>6</sup>) sugiere que es alta<sup>1,3,4,8</sup>.

El patrón de sensibilidad a los antibacterianos de *L. monocytogenes* ha permanecido relativamente estable con el paso de los años: es sensible “in vitro” a una amplia gama de antibacterianos como penicilina, ampicilina, gentamicina, eritromicina, tetraciclinas, rifampicinas, cotrimoxazol y vancomicina, en cambio las fluorquinolonas y las cefalosporinas actuales presentan una pobre actividad, especialmente las de tercera y cuarta generación como cefotaxima y cefepima y todas las cepas son resistentes a fosfomicina<sup>3</sup>.

El monitoreo continuo del curso y la naturaleza de la adquisición y diseminación de resistencia a antibacterianos por *L. monocytogenes* y otros miembros del género, se ha convertido casi en una exigencia para todos los aislados procedentes de ambientes, infecciones clínicas y primordialmente los provenientes de alimentos, ya que constituyen los vehículos de transmisión primaria de la listeriosis<sup>2</sup>. Las



explicaciones posibles de la emergencia de la listeriosis humana transmitida por alimentos, como asunto de interés en Salud Pública, comprenden los cambios importantes en la producción, procesamiento y distribución de los alimentos, la utilización cada vez mayor de la refrigeración como medio de conservación primaria de los alimentos, los cambios en los hábitos de comida de la población, particularmente respecto a la comodidad de los alimentos ya preparados y un incremento del número de personas consideradas de alto riesgo de sufrir la enfermedad<sup>7</sup>.

Teniendo en cuenta que se han registrado el aislamiento de *L. monocytogenes*, *L. innocua* y de *L. ivanovii* a partir de lugares de expendio de pollo y quesos en los mercados de los distritos de Trujillo y La Esperanza (Perú)<sup>13,14,15,16,17</sup>, se planteó la presente investigación que estuvo orientada a determinar la resistencia o sensibilidad de dichos microorganismos a antibacterianos y cuál de ellos tiene un mayor efecto, a fin de recomendar su aplicación.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Cultivos

Siete cultivos de *L. monocytogenes*, 17 de *L. innocua* y 13 de *L. ivanovii* fueron aislados de los lugares de expendio de pollo y queso fresco manipulado y refrigerado en los mercados del distrito de Trujillo y La Esperanza (La Libertad, Perú) durante el 2012<sup>13,14,15,16,17</sup> y mantenidos en el Laboratorio de Fisiología y Genética Microbiana de la Universidad Nacional de Trujillo.

### Reactivación de los cultivos y obtención del inóculo.

Las cepas aisladas e identificadas fueron recuperadas en placas con agar Oxford a 30°C por 24 horas y luego traspasadas a frascos conteniendo agar nutritivo a 30 °C por 24-48 horas. Luego, de tres a cinco colonias fueron transferidas a solución fisiológica 0,85 %, para la obtención de una suspensión bacteriana con un patrón de turbidez McFarland 0,5; el equivalente a 10<sup>8</sup> UFC/ml.

### Preparación de placas con medio de cultivo y siembra.

Se prepararon placas Petri con agar Müller-Hinton (12 a 15 mL por placa) a 45°C, aproximadamente, en las cuales se hizo la siembra por estrías en todas direcciones utilizando u hisopo

### Aplicación de discos de antibióticos<sup>12</sup>.

Sobre la superficie de la placa ya sembrada con la suspensión bacteriana (inóculo) se colocó con ayuda de una pinza estéril los discos de antibióticos y se incubó a 37°C por 24 horas. Los antibacterianos probados fueron: B-Lactámicos (Penicilina y Ampicilina), Macrólidos (Eritromicina), Sulfonamidas (Sulfametoxazol trimetoprim), Quinolonas (Ac. Nalidixico), Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina), Aminoglicósidos (Gentamicina), Glicopéptidos (Vancomicina), Fenicoles (Cloranfenicol), Rifamicinas (Rifampicina) y Tetraciclinas (Tetraciclina).

### Medición del halo

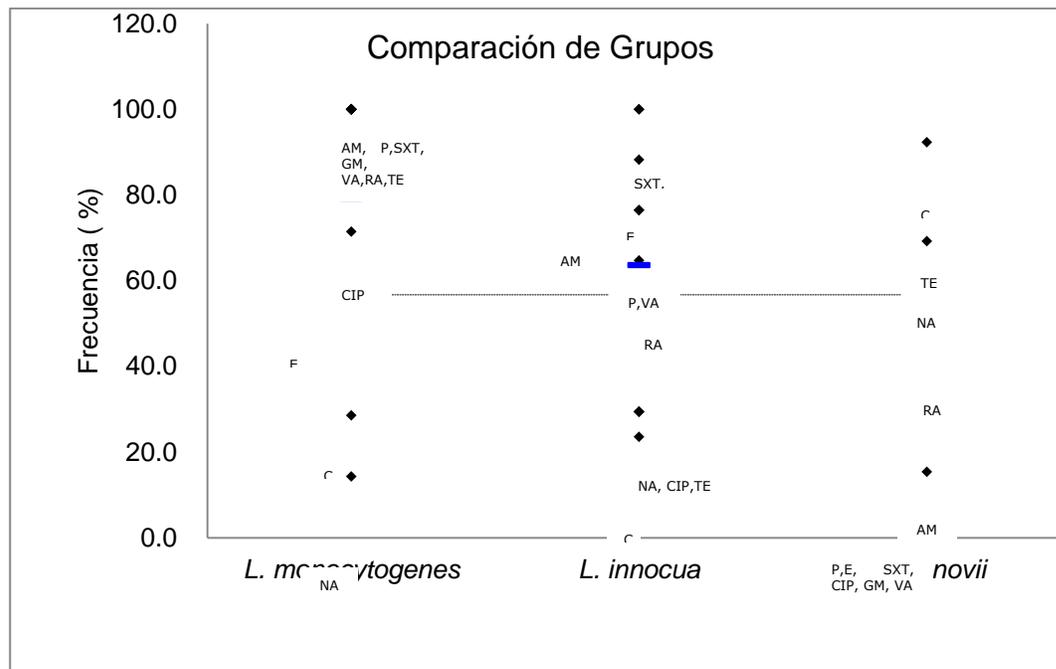
Pasado el tiempo de incubación se midió el diámetro (en milímetros) de la zona alrededor de cada disco, esto fue interpretado de acuerdo a los lineamientos del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), y se clasificó la sensibilidad del antibacterianos en cada cepa, como susceptible,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

## RESULTADOS

Se encontró una frecuencia del 100% de sensibilidad de cultivos de *Listeria Monocytogenes* sobre Ampicilina, Penicilina, Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Vancomicina, Rifampicina y Tetraciclina. Del mismo modo, existe una frecuencia del 100% de sensibilidad de cultivos de *Listeria innocua* sobre Sulfametoxazole Trimetoprim y Gentamicina. Por último, existe mayor frecuencia de sensibilidad de cultivos de *Listeria ivanovii* sobre Cloranfenicol y Tetraciclina (Tabla 1). Asimismo, se evidenció que los antibacterianos que se encuentran por encima de la media aritmética son los mismos que se pueden usar ante infecciones, estos son: Ampicilina, Penicilina, Sulfametoxazol Trimetoprim, Gentamicina, Vancomicina, Rifampicina, Tetraciclina, Eritromicina y Cloranfenicol (Fig. 1).

**Tabla 1.** Frecuencia de la sensibilidad de los cultivos de *Listeria monocytogenes* (*L. mo*), *Listeria innocua* (*L. in*) y *Listeria ivanovii* (*L. iv*) aislados de mercados provenientes de la ciudad de Trujillo (Perú) frente a los antibacterianos seleccionados.

Antibacteriano	Frecuencia (%) de sensibilidad de:		
	<i>L. mo</i>	<i>L. in</i>	<i>L. iv</i>
Ampicilina	100	82	15
Penicilina	100	76	0
Eritromicina	57	88	0
Sulfametoxazole/Trimetoprim	100	100	0
Ácido Nalidíxico	14	29	69
Ciprofloxacina	71	29	0
Gentamicina	100	100	0
Vancomicina	100	76	0
Clorafenicol	29	24	92
Rifampicina	100	65	46
Tetraciclina	100	29	77

**Fig. 1.** Análisis de varianza (ANOVA) de la frecuencia de sensibilidad de *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* y *Listeria ivanovii*. AM=Ampicilina; P= Penicilina; E=Eritromicina; SXT= Sulfametoxazol Trimetoprim; NA=Acido Nalidíxico, CIP=Ciprofloxacina, GM=Gentamicina; VA=Vancomicina; C=Cloranfenicol, RA=Rifampicina; TE=Tetraciclina.

— Representa la Media Aritmética



## DISCUSIÓN

El hecho que las siete cepas de *L. monocytogenes* haya mostrado ser sensible en un 100% a Ampicilina, Penicilina, Sulfametoxazole–Trimetoprim, Gentamicina, Vancomicina, Rifampicina y Tetraciclina, así como una sensibilidad de 71% Ciprofloxacina, significa que estos antibacterianos funcionan de manera efectiva contra el microorganismo, siendo posible la administración de estos medicamentos cuando ocurran infecciones. Por el contrario, la poca resistencia frente a la Eritromicina (57 %), al Cloranfenicol (29 %) y al Ácido Nalidíxico (14%) permite afirmar que no son antibacterianos recomendables. Concordante con estos hallazgos, MacGowan et al<sup>18</sup>, no encontraron ninguna cepa de *L. monocytogenes* resistente a Ampicilina y Gentamicina, lo cual podría deberse a que *L. monocytogenes* posee una sensibilidad natural a aminoglucósidos (Gentamicina), Penicilinas (Ampicilina, Penicilina), Quinolonas (Ac. Nalidíxico, Ciprofloxacina), Rifamicinas (Rifampicina), sin embargo, se cree que existe al menos una cepa resistente a uno o más de los antimicrobianos usados, tal como ha sido evidenciado en una investigación en aislados procedentes de alimentos e infecciones clínicas en la cual se evidenció resistencia a Eritromicina (14 %) y a Cloranfenicol (57%)<sup>2</sup>.

Igualmente, *L. innocua* presentó el mismo esquema de respuesta, es decir, sensible en un 100% para unos (Gentamicina y Sulfametoxazole–Trimetoprim), elevada para otros, Ampicilina (82%), Penicilina (76%), Eritromicina (88%), Vancomicina (76 %) y resistencia en menor grado: Ac. Nalidíxico y Cloranfenicol. Esto significa que los eventos son iguales a lo señalado para *L. monocytogenes* porque, incluso, en ambas especies se observó sensibilidad del 100% para: Ampicilina, Penicilina, Sulfametoxazole–Trimetoprim y Vancomicina. Sin embargo, a pesar que *L. innocua* es una especie ha sido registrada como no patógena, es necesario realizar estos estudios de sensibilidad antibacteriana ante posibles brotes de listeriosis por esta especie.

Por su parte, *L. ivanovii*, como era de esperar, mostró un comportamiento diferente frente a los antimicrobianos porque, por ejemplo, apareció con una frecuencia elevada de sensibilidad para Cloranfenicol, Ácido Nalidíxico y Tetraciclina, aspecto que puede ocurrir, pues se está observando variación en las tres especies estudiadas, hecho que justifica el trabajo por separado, amparado por las pruebas estadísticas como se ha hecho aquí, para proponer específicamente qué antimicrobiano utilizar en eventuales casos de infección: para *L. monocytogenes* se puede utilizar Ampicilina, Penicilina, Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Vancomicina, Rifampicina y Tetraciclina ya que se encuentran por encima de la media; en el caso de *L. innocua*, Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Eritromicina, Ampicilina, Penicilina, Vancomicina y muy cerca de la media, Rifampicina y para *L. ivanovii*, Cloranfenicol, Tetraciclina y Ácido Nalidíxico. Lamentablemente, no se han hallado trabajos anteriores que permitan hacer las comparaciones con los resultados obtenidos en la presente investigación.

Como se ha mencionado, el patrón de sensibilidad a los antibióticos de *L. monocytogenes* ha permanecido relativamente estable con el paso de los años, habiéndose establecido que es sensible a una amplia gama de antibióticos como penicilina, ampicilina, gentamicina, eritromicina, tetraciclinas, rifampicina y vancomicina<sup>19</sup>, aspecto que ha sido evidenciado en el presente trabajo, pero existe una variación en el grado de sensibilidad de una especie a otra, fenómeno que podría deberse a la variación del grado de virulencia inherente, como ha sido señalado por entidades encargadas de estandarizar los procedimientos que conducen a la determinación de la sensibilidad o resistencia de bacterias a los antimicrobianos<sup>20,21</sup>.

## CONCLUSIÓN

- *Listeria monocytogenes* es 100% sensible a Ampicilina, Penicilina, Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Vancomicina, Rifampicina y Tetraciclina; *Listeria innocua* a Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Eritromicina, Ampicilina, Penicilina y Vancomicina y *Listeria ivanovii* a Cloranfenicol, Tetraciclina y Ácido Nalidíxico.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schöbitz R, Ciampi L, Nahuelquin Y. *Listeria monocytogenes* un peligro para la industria alimentaria. *Agro sur* 2009; 37 (1): 1-8
2. Villalobos L, Martínez R, Susceptibilidad antimicrobiana de *Listeria* spp. aisladas de alimentos durante el periodo 2003-2004. Cumaná, Venezuela. *Rev Soc Venez Microbiol* 2006; 26:31-34
3. Torres K, Sierra S, Poutou R, Carrascal A, Mercado M. Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. *Rev MVZ Córdoba* 2005; 10(1):511-543
4. Muñoz A, Vargas M, Otero L, et al. Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y supermercados de cadena, Bogotá, D.C, 2002-2008. *Biomédica* 2011; 31:428-39
5. Elika, Fundación Vasca para la seguridad agroalimentaria, *Listeria monocytogenes*. Granja Modelo Arkaute 2006. 1- 13
6. Comisión del Codex Alimentarios. Observaciones sobre el proyecto de directrices sobre la aplicación de principios generales de higiene de los alimentos para el control de *Listeria monocytogenes* en los alimentos listos para el consumo. EE. UU. 2006: 82-96
7. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004. *Listeria monocytogenes* capítulo 2.10.14: 1222-1233
8. Gallegos J, Arrieta G, Máttar S, Poutou R, Trespalacios A, Carrascal A. Frecuencia de *Listeria* spp., en quesos colombianos costeños. *Rev MVZ Córdoba* 2007; 12(2) : 996-1012
9. Rodríguez E, Cabrera L, Colina G. *Listeria monocytogenes* en queso amarillo madurado tipo Edam y su resistencia al pH y salinidad. Laboratorio de Microbiología, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. 2009; 71 – 79
10. Chávez R. Evaluación del control de *Listeria monocytogenes* usando métodos físicos y químicos en condiciones de laboratorio y sobre superficies contaminadas en relación al tiempo. Trujillo, Perú. [Tesis para optar por el grado de Biólogo - Microbiólogo]. 2011
11. Albarracín Y, Poutou P, Carrascal A. *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en leche cruda de cabra *Revista MVZ Córdoba*. 2008; 13(2): 1326-1332
12. Malbrán G. Métodos estandarizados para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana en bacterias aisladas de animales: test de difusión por discos y test de dilución. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Departamento Bacteriología. Servicio Antimicrobianos. Buenos Aires, Argentina. 2001
13. Flores J. Aislamiento y caracterización bioquímica de especies de *Listeria* sp. obtenidas de lugares de expendio de pollo en mercados del Distrito de Trujillo, Departamento La Libertad-Perú en los meses de Mayo- Noviembre del 2011. Tesis de Biólogo-Microbiólogo. UNT. Trujillo, Perú. 2012.
14. Toribio D. Aislamiento y caracterización bioquímica de especies de *Listeria* sp. obtenidas de lugares de expendio de pollo en mercados del Distrito de La Esperanza, Departamento La Libertad-Perú en los meses de Mayo- Noviembre del 2011. Tesis de Biólogo-Microbiólogo. UNT. Trujillo, Perú. 2012.
15. Floriano P. Aislamiento y caracterización bioquímica de especies de *Listeria* sp. obtenidas de quesos elaborados artesanalmente de procedencia del distrito de Otuzco, departamento de La Libertad - Perú en los meses de Mayo- Noviembre del 2011. Tesis de Biólogo-Microbiólogo. UNT. Trujillo, Perú. 2012
16. Pita J. Aislamiento y caracterización bioquímica de especies de *Listeria* sp. obtenidas de quesos elaborados artesanalmente de procedencia del distrito de Bambamarca, departamento de Cajamarca - Perú en los meses de Mayo – Noviembre del 2011. Tesis de Biólogo Microbiólogo. UNT. Trujillo, Perú. 2012.
17. Sánchez L. Identificación bioquímica y caracterización molecular de cultivos de *Listeria* sp. obtenidas de lugares de expendio de pollo y quesos en Trujillo. Tesis de Biólogo-Microbiólogo. UNT. Trujillo, Perú. 2012.
18. Macgowan A, Reeves D, Mclauchlin J. Antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes*. *Lancet* 1990; 336: 513-514.
19. Oteo J, Alós J. Servicio de Microbiología. Control de Calidad SEIMC. Hospital de Móstoles. Móstoles. Madrid. <http://www.seimc.org/control/revisiones/bacteriologia/listeria.pdf> .2012.
20. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard—Second Edition. NCCLS document M31-A2 [ISBN 1- 56238-461-9]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. CLSE document M100-S17 [ISBN 1- 56238-625-5]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.



# Supervivencia de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* en agua potable de cuatro distritos de Trujillo (Perú)

## Survival of *Salmonella typhi* and *Salmonella enteritidis* in drinking water of four Districts from Trujillo (Peru)

Raquel Moya-Egoavil<sup>1</sup>, Pedro Alvarado-Salinas<sup>2</sup> y Nelly Vásquez-Valles<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tesista de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). <sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología UNT. Trujillo, Perú

### RESUMEN

Se determinó la supervivencia de *Salmonella typhi* y *S. enteritidis* en agua potable proveniente de los distritos de Florencia de Mora, El Porvenir, La Esperanza y Laredo (Trujillo, Perú). En cada distrito se recolectó 1000mL de agua potable, que fue esterilizada por filtración a través de membrana y se distribuyó en dos matraces con 300 mL a cada uno a los cuales se inoculó *S. typhi* y *S. enteritidis*, a una concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/mL. Para construir las curvas de supervivencia, los recuentos se realizaron cada 30 minutos durante 12 horas, para lo cual se utilizaron placas petri conteniendo PCA usando el método de siembra por superficie. El agua potable mantuvo sus características físico-químicas según el rango establecido según la OMS. De acuerdo al análisis estadístico se encontró que no existe diferencia significativa entre las curvas de supervivencia de *S. typhi* en agua potable de los distritos antes mencionados, lo mismo ocurrió para las curvas de supervivencia de *S. enteritidis*. *S. enteritidis* sobrevive por tiempo más prolongado que *S. typhi*.

**Palabras clave:** Supervivencia, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, agua potable.

### ABSTRACT

Survival of *Salmonella typhi* and *Salmonella enteritidis* in fresh water from the districts of Florencia de Mora, El Porvenir, La Esperanza and Laredo (Trujillo, Peru) were determined. Samples of water (approximately 1000mL) were collected, immediately sterilized by membrane filtration technique and distributed in two glass flasks, placing 300 mL of sterile water each. Then, *Salmonella typhi* and *Salmonella enteritidis*, at concentration of  $3 \times 10^8$ CFU/mL, were inoculated in each flask. To construct the survival curves, the counts were performed every 30 minutes for 12 hours, which were used petri dishes containing PCA using the method of planting area. Drinking water continued its physicochemical characteristics as the range set by WHO. According to statistical analysis found no significant difference between the survival curves of *Salmonella typhi* in drinking water of the districts mentioned above, so did the survival curves for *Salmonella enteritidis*. Significantly, *Salmonella enteritidis* can survive much longer than *Salmonella typhi*.

**Keywords:** Survival, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, drinking water.



## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas por toxoinfecciones causan a nivel mundial alrededor de 1,8 millones de muertes, el 90% de las cuales corresponden a niños menores de cinco años de países en vías de desarrollo, porque el 88% de tales enfermedades diarreicas son producto de un abastecimiento de agua insalubre, así como de un saneamiento ambiental y una higiene sanitaria deficientes<sup>1,2,3</sup>.

Las salmonelosis constituyen la primera causa de toxoinfecciones alimentarias o por consumo de agua insalubre en el mundo, habiéndose determinado que están implicados más de 2.000 serotipos, de los cuales el serotipo *Salmonella enteritidis* es el predominante (56,8% de casos), seguido por el serotipo *Typhimurium*<sup>4,5,6</sup>.

Al mismo tiempo que se ha registrado los brotes de diarrea por bacterias entre ellas *Salmonella*, se ha investigado el efecto del cloro y sus derivados, con el propósito de determinar la cantidad que debe usarse sin ocasionar daños laterales a la salud; estas investigaciones han dado ha conocer que *S. enteritidis* necesita del incremento en la concentración de HClO para ser eliminada en presencia de materia orgánica y que las buenas prácticas en la desinfección del agua y de los alimentos debe iniciarse en la producción y procesamiento habiéndose establecido las Normas para su regulación<sup>7,8,9,10,11,12</sup>.

Teniendo en cuenta la importancia que tiene el agua en la alimentación y que, como se ha mencionado es el principal vehículo para contraer diversas infecciones, entre ellas las causadas por agentes de intoxicación y, asimismo, que no se ha determinado qué tiempo de sobrevivencia tienen las especies de bacterias en el agua de consumo de los distritos de la provincia de Trujillo, se diseñó una investigación que estuvo dirigida a evaluar la supervivencia de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* en agua potable de los distritos de Florencia de Mora, El Porvenir, Laredo y La Esperanza, aledaños a la ciudad de Trujillo (Perú).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### **Bacterias:**

Los cultivos puros de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* fueron proporcionados por el Laboratorio Referencial de Salud de la ciudad de Trujillo (Perú).

### **Muestra y muestreo de agua:**

Se obtuvo muestras de 1000mL de agua potable de grifos domiciliarios en un punto específico de muestreo de los distritos aledaños a la ciudad de Trujillo: El porvenir, Florencia de Mora, Laredo y La Esperanza. El tipo de muestreo fue No Probabilística (por conveniencia). Estos distritos están localizados en la zona marginal de Trujillo, capital del Departamento de La Libertad (Perú).

### **Reactivación del cultivo<sup>6</sup>**

Para la reactivación, se sembró *S. typhi* y *S. enteritidis* en agar nutritivo y se llevó a incubación durante 24 horas a una temperatura de 37°C.

### **Toma de muestra y transporte:**

De los distritos mencionados anteriormente, de grifos de un punto específico, se recolectó muestras de agua potable en volumen aproximadamente de 1000 ml, los mismos que fueron transportados al laboratorio de Microbiología de Alimentos del Departamento Académico de Microbiología y Parasitología, para su procesamiento.

### **Preparación del inoculo<sup>16</sup>**

Se sembró *S. typhi* y *S. enteritidis* en agar nutritivo y se llevó a incubación durante 24 horas a una temperatura de 37°C. Transcurrido el tiempo indicado, se realizó una suspensión, en solución salina fisiológica estéril, hasta obtener un equivalente al tubo número 01 de Mac Farland (concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/ml).

### **Esterilización del agua potable**



Se esterilizó las muestras de agua potable (aprox. 1000 ml) mediante la técnica de filtración por membrana<sup>(25)</sup>. Posteriormente se distribuyó en 2 matraces estériles, 300 ml de agua potable estéril en cada uno.

### Mediciones de parámetros de agua potable<sup>14,16</sup>

Del agua potable estéril restante, se procedió a realizar las mediciones de: pH; Temperatura; Conductividad eléctrica mediante un conductímetro; Cloro libre residual mediante el método del DPD; DQO (Demanda Química de Oxígeno) por el método de oxidabilidad con permanganato de potasio.

### Inoculación<sup>19,20</sup>

En el matraz conteniendo 300 ml de agua potable estéril, se le inoculó 1mL de la suspensión de *S. typhi*. De igual manera se trabajó para *S. enteritidis*.

### Condiciones de ensayo

Se incubó a temperatura ambiente y se monitoreó cada 30 minutos. Este sistema de ensayo se realizó por cuadruplicado, utilizándose 4 muestras diferentes para cada uno de los distritos

### Determinación de la población bacteriana<sup>6,15,18</sup>

Se determinó mediante la técnica de recuento en placa<sup>3</sup>, utilizando el medio de cultivo sólido PCA. Se realizaron las diluciones pertinentes, utilizando solución salina fisiológica con tiosulfato de sodio (diluyente), a una concentración final de 100 µg TS/ml y se procedió a sembrar en superficie 0,1ml de las últimas diluciones, cada 30 minutos durante 12 horas, realizando cada ensayo por triplicado.

### Análisis estadístico

Se realizó cuadros y gráficas unidimensionales, medidas Estadísticas tales como la media y promedios aritméticos. Además del análisis de varianza al realizar los contrastes de hipótesis, aplicando la prueba F (Fisher) se realizó la prueba T-student<sup>17</sup>.

## RESULTADOS

Se encontró que los parámetros físico-químicos tomados en cuenta (pH, DQO, conductividad eléctrica, cloro libre residual) del agua de los distintos distritos, se hallan dentro de los parámetros establecidos por Organizaciones Internacionales (Tabla 1). Asimismo, que las curvas de crecimiento adoptan el mismo comportamiento (Figs. 1 y 2) y que en todos los casos, *S. enteritidis* permanece viable por mayor tiempo que *S. typhi* (Figs. 3, 4, 5 y 6).

**Tabla 1:** Parámetros físico-químicos del agua potable de los distritos de Florencia de Mora, El Porvenir, La Esperanza y Laredo (Trujillo, Perú) y los establecidos por la OMS y otras Organizaciones Internacionales\*.

Parámetros	U.M	Florencia de Mora	La Esperanza	El Porvenir	Laredo	Parámetros establecidos *
Cloro libre residual	Cl mg/L	0,23	0,20	0,27	0,25	0,2-0,5
DQO	mg/L	6,51	7,23	7,11	6,8	<10
pH		7,28	7,23	7,13	7,29	6,5-8,5
Conductividad eléctrica	µs/cm	278	276.5	308	304	50-1500
Temperatura	°C	24-25	24-25	24-25	24-25	22-27

DQO= Demanda Química de Oxígeno; µs/cm= micro-siemens por centímetro.

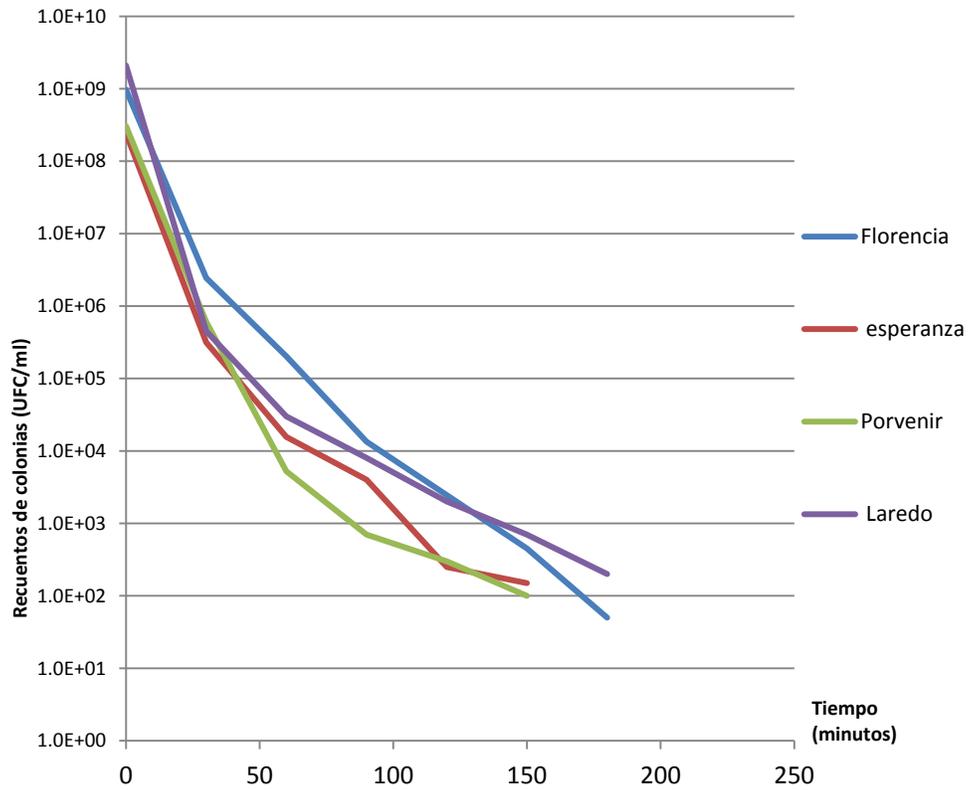


Fig. 1. Curvas de supervivencia ( $p < 0,05$ ) de *Salmonella typhi* en agua potable provenientes de los distritos de Florencia de Mora, La Esperanza, El Porvenir y Laredo (Trujillo, Perú).

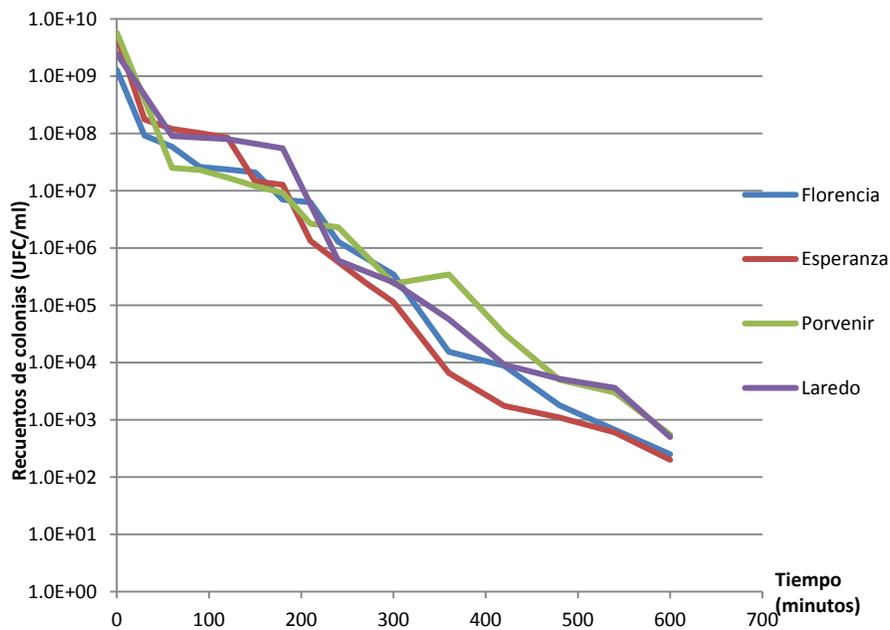


Fig. 2. Curva de supervivencia ( $p < 0,05$ ) de *Salmonella enteritidis* en agua potable provenientes de los distritos de Florencia de Mora, La Esperanza, El Porvenir y Laredo (Trujillo, Perú).

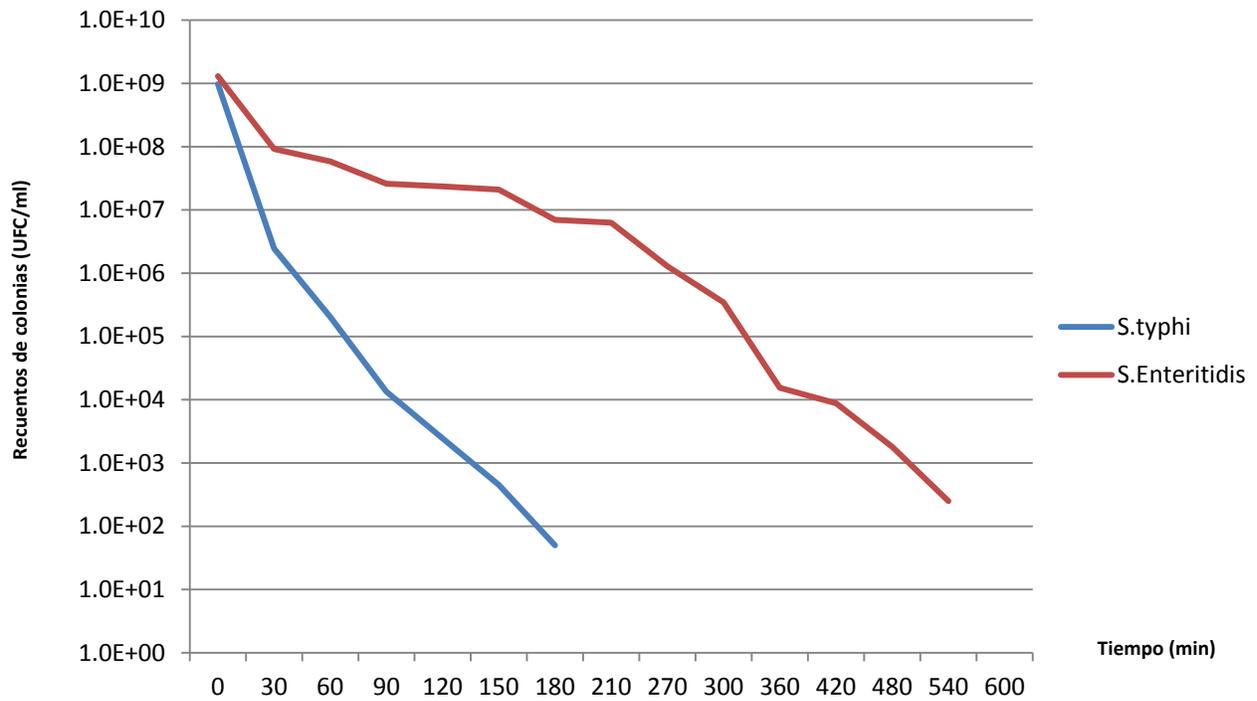


Fig. 3. Curva de supervivencia de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* en agua potable proveniente del distrito de Florencia de Mora, Trujillo-Perú (valor de T = 0.00).

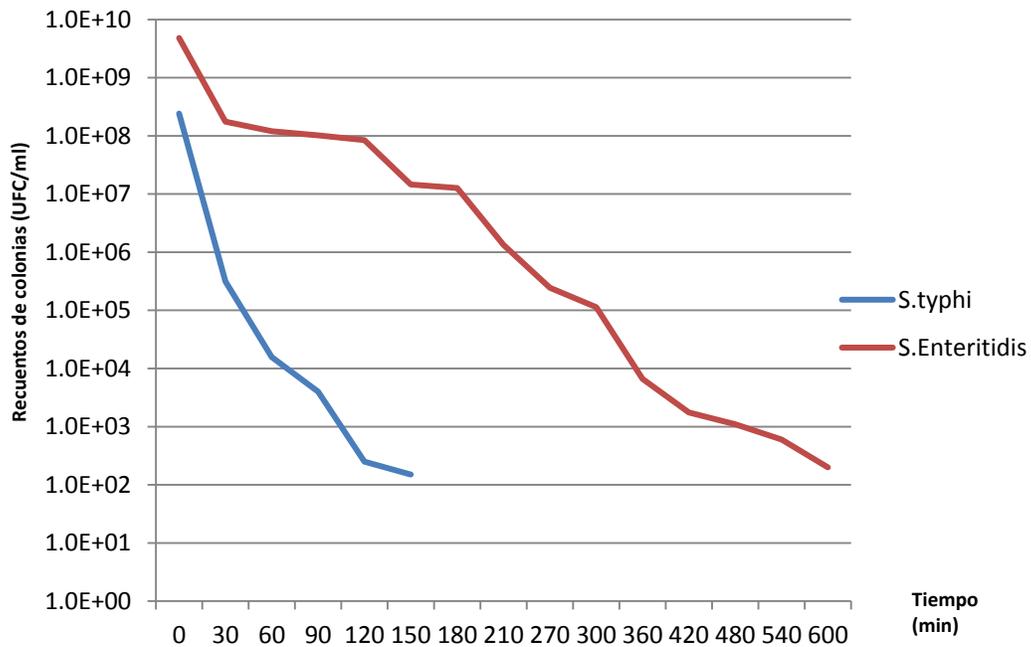


Fig. 4. Curva de supervivencia de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* en agua potable proveniente del distrito de La Esperanza, Trujillo-Perú (valor de T = 0.00).

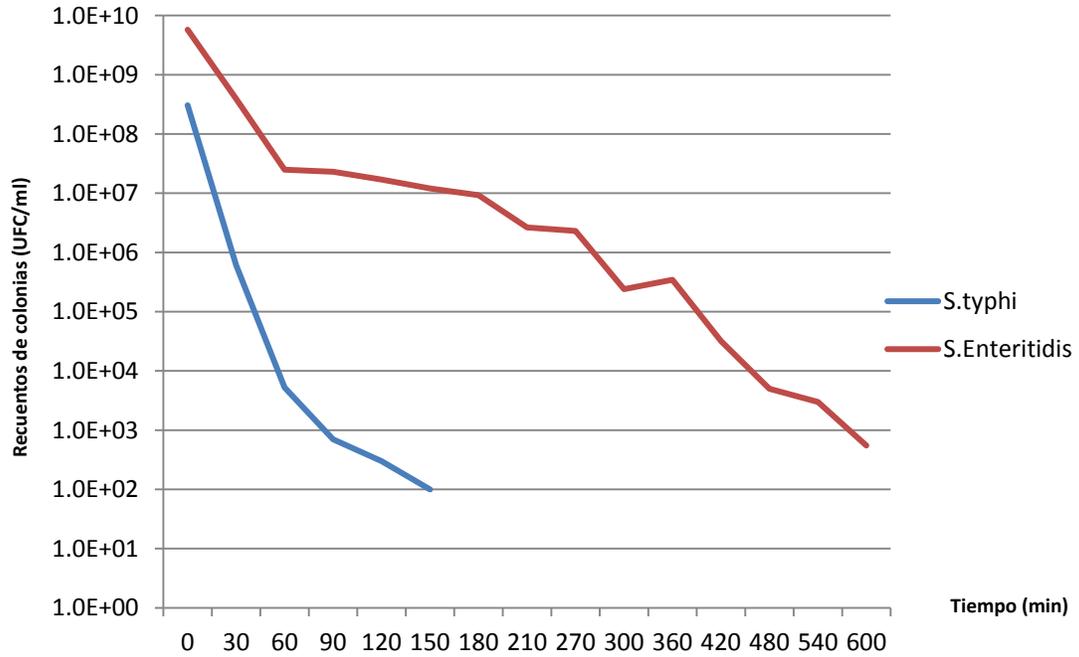


Fig. 5. Curva de supervivencia de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* en agua potable proveniente del distrito de El Porvenir, Trujillo-Perú (valor de T = 0.00).

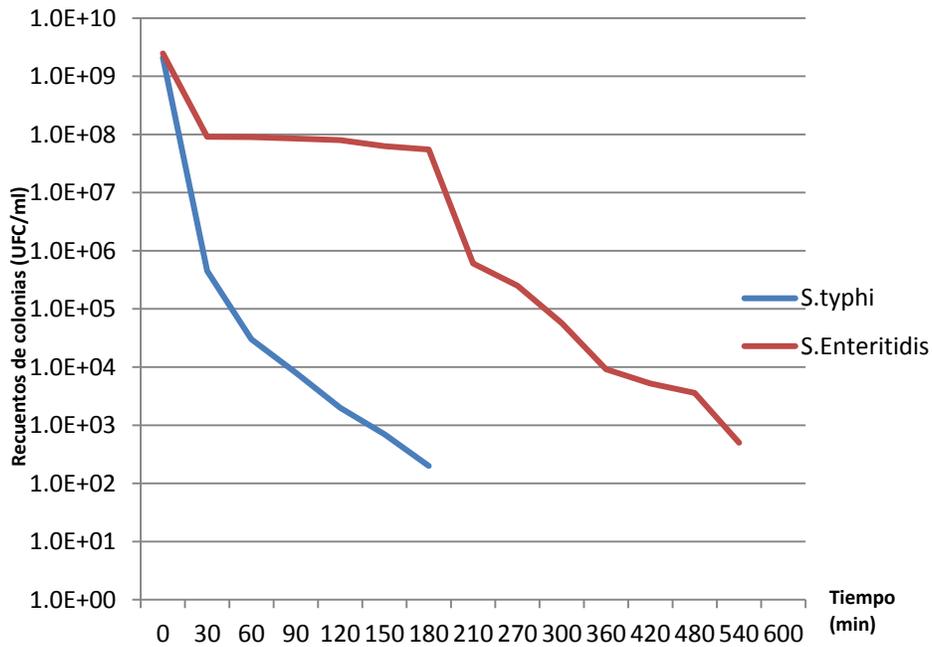


Fig. 6. Curva de supervivencia de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* en agua potable proveniente del distrito de Laredo, Trujillo-Perú (valor de T = 0.00).



## DISCUSIÓN

Todos los parámetros determinados en el presente trabajo son indicadores de la calidad del agua potable, pero parámetros como temperatura, pH y cloro libre residual, van a influenciar en la calidad microbiológica a diferencia de los parámetros como la DQO, y la conductividad eléctrica del agua, las cuales son pruebas indicadoras de contaminación pero no de contaminantes para la salud humana. De hecho, todos los seres humanos consumen a diario bebidas (soluciones acuosas) que poseen valores increíblemente altos en estos parámetros, sin perjuicio para su salud<sup>14</sup>.

El DQO se emplea para determinar el contenido de materia orgánica en aguas; estos compuestos orgánicos son oxidados, en un medio ácido, por un agente químico (dicromato de potasio), pero no necesariamente pueden ser biodegradables (acción microbiológica)<sup>14,18</sup>. El DQO del agua potable se encontró en un rango de 6,51-7,23 mg/l; estando dentro de los límites permisibles para DQO en agua potable (<10 mg/l)<sup>21</sup>. Al estar dentro de los límites permisibles se podría deducir que no tuvo influencia en la supervivencia de *S. typhi* y *S. enteritidis*.

Se debe tener en cuenta que el pH no ejerce efectos directos en los consumidores, pero es importante por ser uno de los parámetros indicadores de la calidad del agua potable, por lo tanto su determinación debe hacerse in situ, inmediatamente después de haberse recogido la muestra, ya que puede sufrir variaciones grandes en el transcurso del tiempo debido al transporte o una permanencia prolongada en recipientes<sup>19</sup>. El agua potable tuvo rangos pH de 7,13 a 7,29; los cuales estuvieron entre los valores establecidos por la OMS (6,5-8,5) y están dentro de los valores que no afectan a *S. typhi* y *S. enteritidis*<sup>14,15,18</sup>. Las bacterias experimentan diferentes tipos de “estrés” en su vida diaria, a los cuales deben adaptarse. *Salmonella* tendrá que sobrevivir al pH extremadamente bajo del estómago y a la acción antibacteriana de los ácidos grasos de cadena corta presentes en el intestino y además, tendrá que tolerar episodios de bajo pH cuando se encuentre en el interior del fago-lisosoma del macrófago<sup>6,15</sup>. El fenómeno de tolerancia inducida a estrés ácido estriba en que se induce la síntesis de proteínas específicas, las cuales protegen a las células a pHs extremadamente ácidos. Los pH intracelular bajos, activa la expresión de genes que codifican descarboxilasas de aminoácidos y así pueden elevar el pH interno, ya que catalizan reacciones en las que se consumen protones<sup>20,21</sup>.

Asimismo, la conductividad eléctrica estuvo en el rango de 278 a 308  $\mu\text{s}/\text{cm}$ ; al igual que los demás parámetros, dentro de los rangos establecidos por la OMS (50-1500  $\mu\text{s}/\text{cm}$ ), se debe tener en cuenta que mientras más impurezas hay en el agua potable, mayor es la conductividad eléctrica, es por ello la importancia de monitorearla<sup>14,21</sup>. Desde luego, por encima de los niveles 1500-1800  $\mu\text{s}/\text{cm}$  se puede esperar que ocurran cambios en los cultivos más sensibles<sup>7</sup>. El valor de la conductividad es directamente proporcional a la concentración de sólidos disueltos, se conoce además que la conductividad de una solución se determina por un movimiento molecular, la temperatura influye en dicho movimiento, por lo que es necesario tomarla en cuenta cuando se realizan mediciones de precisión. Generalmente, para realizar mediciones comparativas, la temperatura de referencia es de 20 °C ó 25 °C<sup>14,16,21</sup>. En el presente trabajo la temperatura se mantuvo dentro de dicho rango.

El parámetro químico más importante, puesto que interviene en la supervivencia de *S. typhi* y *S. enteritidis*, es la presencia de cloro libre residual en el agua potable de los diferentes distritos de Trujillo. El cloro residual libre es la cantidad de cloro en el agua en forma de ácido hipocloroso o hipoclorito, las cuales son la forma activa del cloro, dándole el poder desinfectante<sup>6,7</sup>. En el presente trabajo la cantidad de cloro libre residual estuvo en el rango de 0.2 a 0.3 mg Cl/L, cantidad aceptada que se encuentra dentro de los límites establecidos (0,5- 0,2 mg/L) en toda agua potable<sup>14,21</sup>.

Las muestras de agua potable al estar entre los valores permitidos, indican que tiene una adecuada desinfección, conteniendo la cantidad necesaria para eliminar los microorganismos. Esto explica las curvas de supervivencia; donde se observa que a tiempo transcurrido de 30 minutos de inoculada la suspensión bacteriana de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis*, se obtuvieron porcentajes de muerte de 99.8% y 94.71 %. Las células bacterianas afectadas por el cloro, liberan ácidos nucleicos, proteínas y potasio y las funciones de la membrana, tales como la respiración y transporte activo, son más afectadas que los procesos citoplasmáticos<sup>7,8,9</sup>. Existe la hipótesis que la pared celular, bajo estrés ambiental, podría



interactuar con el cloro, el cual parece causar alteraciones físicas, químicas y bioquímica, por lo tanto, destruye la barrera protectora de la célula, con lo que concluyen las funciones vitales y da lugar a la muerte del microorganismo. Una posible secuencia sería la interrupción de la barrera de la pared celular mediante reacciones del cloro con sitios proyectados en la superficie de células, terminación de las funciones asociadas con membranas y terminación de las funciones celulares<sup>8</sup>.

Al mismo tiempo, la efectividad del cloro también se ve afectada por el pH del agua, la cloración no es efectiva si el pH es mayor de 7,5 o menor de 6,5. Además, la acción bactericida se debe a la actividad de ácido hipocloroso (HClO), el cual se favorece a pH menores de 7,5 ya que a pH mayor tiende a generar ion hipoclorito (ClO<sup>-</sup>), el cual tiene una actividad reducida debido a su carga eléctrica y no atraviesa fácilmente la membrana celular de las bacterias<sup>7,8,9</sup>.

Al obtener los recuentos de las poblaciones de *S. typhi* y *S. enteritidis*, se utilizó diluciones de solución salina fisiológica (SSF) conteniendo tiosulfato de sodio, a una concentración final de 100µg/ml<sup>10,20</sup>, para poder inactivar el cloro tanto en las diluciones así como en las placas de siembra. Ya que al inicio de los ensayos utilizando sólo diluciones SSF, no permitió realizar los recuentos por falta de desarrollo bacteriano. Cabe resaltar además que a partir de las 18 horas de incubada *S. enteritidis*, mostró buen desarrollo bacteriano en las placas petri a diferencia de *S. typhi*, la cual aún a las 36 horas se pudo hacer lectura.

El hecho de que las curvas de supervivencia sean semejantes ( $p > 0,05$ ), significa que el agua de los distritos estudiados es similar en términos de calidad microbiológica, al margen de su cantidad. De igual modo, en lo que corresponde al tiempo de supervivencia, verificándose lo señalado para las curvas de supervivencia y corroborando que, efectivamente, *S. enteritidis* tiene más tiempo de supervivencia<sup>3,6</sup>, lo cual podría estar relacionado con el hecho de que *S. enteritidis* podría tener más resistencia al ácido hipocloroso que *S. typhi*<sup>6,7</sup>. En efecto, se ha logrado identificar algunos de los mecanismos defensivos de las salmonelas en ambientes de pH ácido extremo, determinando las formas en las que dos serovariedades del género *Salmonella* tales como: *S. typhimurium* y *S. senftenberg* se defienden ante esta agresión externa, resaltando que están implicados genes específicos (genes: *adi* y *cad*, respectivamente). Se identificó además sistemas de protección en 2 puntos concretos como es en la membrana bacteriana y en sus sistemas homeostáticos; esto podría inducir que *S. enteritidis* podría actuar de la misma manera respecto a la tolerancia al cloro o poseer algunos de estos genes en estudio, explicando así su supervivencia en este trabajo diferenciándola de *S. typhi*<sup>6,15</sup>.

Se debe recalcar que si bien es cierto las curvas de supervivencia no tienen significancia estadísticamente, *S. enteritidis* sobrevive más tiempo que *S. typhi*; y tomando en cuenta que el parámetro determinante del agua potable que influye en la supervivencia de éstas bacterias, es la concentración de cloro libre residual; se concluye que se debe mantener los niveles de desinfección indicados para el agua potable, ya que si no fuese así, en una posible contaminación con *Salmonella enteritidis*, podría ser perjudicial para la comunidad.

## CONCLUSIONES

- *Salmonella enteritidis* tiene estadísticamente el mismo comportamiento en agua potable de diferentes distritos, pero en base a sus recuentos, mantiene una curva de supervivencia decreciente por más tiempo que *Salmonella typhi*.
- No existe diferencia significativa entre las curvas de supervivencia de *Salmonella typhi* en agua potable de los distritos de Florencia de Mora, La Esperanza, el Porvenir y Laredo.
- No existe diferencia significativa entre las curvas de supervivencia de *Salmonella enteritidis*, en agua potable de los distritos de Florencia de Mora, La Esperanza, el Porvenir y Laredo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Panamericana de la Salud-Lima. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. Guía para mejorar la calidad del agua Ámbito rural y pequeñas ciudades. 2007.



2. Fuentes F, Campas N, Aguilar-Apodaca M, Meza-Montenegro M. Calidad Microbiológica del Agua de Consumo Humano de Tres Comunidades Rurales del Sur de Sonora. *Rev Salud Pública y Nutrición* 2007; 8 (3): 21-28.
3. Gloria Vásquez de Plata. La Contaminación de los Alimentos, un Problema por Resolver. *Salud UIS*. 2003; 35: 48-57
4. Escartin EF. Potential *Salmonella* transmission from ornamental fountains. *J Environm Health*. 2002; 65: 9-12.
5. Rodríguez D, Torres F, Gutiérrez E, et al. *Salmonella typhimurium*, determination in compost artificially inoculated in a lettuce crop. *Acta biol Colomb* 2008; 13 (3): 61-72.
6. Hernandez-domínguez C, Hernandez A, Chaidez C, Rendon SG, et al. Detección de *Salmonella* y coliformes fecales en agua de uso agrícola para la producción de melón. *Redalyc (México)*. 2008; 34: 75-84.
7. Henao RS, Sierra PR, Gaitán AJ. Actividad Bactericida del Acido Hipocloroso. *Rev Fac Med*. 2003; 51(3): 136-142
8. Muñoz CJ, Mafla CL. Monitoreo y Evaluación del cloro residual libre en el sistema principal de distribución del Acueducto Cestillal El diamante ACUCESDI, área rural del municipio Pereira-Risaralda. Universidad tecnológica de Pereira; 2007
9. Organización Mundial de la Salud. Guidelines for drinking water quality, 3ra ed. Ginebra: OMS, 2009.
10. CEPIS/OPS. Principios básicos de la desinfección del agua. Guías para la selección y aplicación de tecnologías de desinfección del agua para consumo humano en pueblos pequeños y comunidades rurales en América Latina y el Caribe/OPS. 2001; pp.1-12
11. Organización Panamericana de la Salud. Las condiciones de salud en las Américas. 19th ed. Washington D.C. 1990; pp.34-56.
12. Ramesh N, Carr LE, Wheaton FW. Serial disinfection with heat and chlorine to reduce microorganism populations on poultry transport containers. *J Food Froto* 2003; 66(5):793-7.
13. Ingram, PR, Homer NZ, Smith RA, Pitt AR, Wilson CG, Olejnik O. et al. The interaction of sodium chlorite with phospholipids and glutathione: a comparison of effects in vitro, in mammalian and microbial cells. *Arch Bioch Bioph*. 2003; 410(1):121-133.
14. American Society for testing and Materials (ASTM). Annual book of Standards. Determinación de Conductividad Eléctrica del agua. USA. 1994.
15. Caffer MI, Terragno N, Binsztein R. Manual de Procedimientos Diagnostico y Caracterización de *Salmonella* spp. Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán". Centro Regional de Referencia del WHO Global *Salmonella* Surv. para América del Sur. 2008.
16. Microorganismos de los alimentos, Técnicas de análisis microbiológico. ICMSF. 2da edición. Zaragoza España: Editorial Acribia;1994
17. Moya R. Estadística Descriptiva. España: Editorial San marcos EIRL; 2007
18. Organización Mundial de la Salud. Norma Técnica Nacional para la Calidad del Agua Potable. OPS/OMS. Acuerdo No.O84del 31 de Julio de 1995.
19. APHA, AWWA, WPCF. Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales. México: Edit. Díaz de Santos. 2003.
20. Koutsomanis K, Tassou CC, Taoukis PS, Nychas GJE. Modeling of the effectiveness of a natural antimicrobial on *Salmonella enteritidis* as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements. *J Appl Microbiol*. 1998; 84: 981.
21. American Society for testing and Materials. Annual book of Standards. Determinación de Conductividad eléctrica del agua. Método ASTM D 1125-91; 1994.



# Concentración Mínima Inhibitoria del extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Baccharis genistelloides*, *Perezia multiflora*, *Senecio sublutescens* y *Jungia paniculata* del Parque Nacional Huascarán (Perú) frente a cepas bacterianas de interés clínico

Minimum Inhibitory Concentration of hydroalcoholic extract of stems and leaves of *Baccharis genistelloides*, *Perezia multiflora*, *Senecio sublutescens*, and *Jungia paniculata* from Huascarán National Park (Peru) against bacterial strains of clinical interest

Edwin Vega Portalatino<sup>1</sup> y Eloy López Medina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tesista de la Escuela AP de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo (UNT), Trujillo, Perú.

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias Biológicas, UNT.

## RESUMEN

En trabajos previamente realizados en algunas plantas altoandinas han registrado la presencia de metabolitos secundarios que presentan acciones terapéuticas contra diferentes enfermedades. El objetivo de la investigación fue determinar la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Baccharis genistelloides*, *Perezia multiflora*, *Senecio sublutescens* y *Jungia paniculata* del Parque Nacional Huascarán (Perú) frente a cepas bacterianas de interés clínico. Para ello se trabajó con extractos hidroalcohólicos 50% de las muestras de las plantas a concentraciones de 25, 20, 15, 10 y 5 mg/mL, los cuales fueron inoculados con las cepas bacterianas en microplacas en un ambiente estéril. La evaluación se realizó mediante la observación del crecimiento bacteriano y se reportó crecimiento e inhibición total para el cálculo de la Concentración Mínima Inhibitoria. Se concluye que solamente *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* dentro de los microorganismos usados son inhibidos en los ensayos realizados.

**Palabras clave:** *Baccharis genistelloides*, *Perezia multiflora*, *Senecio sublutescens* y *Jungia paniculata*, concentración mínima inhibitoria, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*

## ABSTRACT

Previous works in some Andean plants have recorded the presence of secondary metabolites that have therapeutic actions against different diseases. The objective of the research was to determine the minimum inhibitory concentration of the hydroalcoholic extract of stems and leaves of *Baccharis genistelloides*, *Perezia multiflora*, *Senecio sublutescens* and *Jungian paniculata* obtained in Huascarán National Park against bacterial strains of clinical interest. For this, we worked with 50 % hydroalcoholic extracts of plant samples at concentrations of 25, 20, 15, 10 and 5 mg / mL, which were inoculated with the bacterial strains in microplates in a sterile environment. The evaluation was performed by observing the growth and bacterial growth and total inhibition for the calculation of the

minimum inhibitory concentration was reported. We conclude that only *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* within the microorganisms used are inhibited in trials.

**Keywords:** *Baccharis genistelloides*, *Perezia multiflora*, *Senecio sublutescens* y *Jungia paniculata*, concentración mínima inhibitoria, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*



## INTRODUCCIÓN

El Parque Nacional Huascarán cuenta con un alta diversidad en flora con tres familias predominantes: Asteraceae, Poaceae y Scrophulariaceae. El género con más especies es *Senecio*, con 39 especies, seguida por *Calamagrostis*, *Werneria*, *Poa*, *Solanum*, *Calceolaria*, *Lupinus*, *Baccharis*, *Valeriana*, etc<sup>1</sup>.

Muchas de las plantas altoandinas de interés medicinal presentan metabolitos secundarios en sus tallos y/o hojas que inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas, tales como, entre otras: *Oreocallis grandiflora*, *Senecio rhizomatus*, *Satureja elliptica*, *S. sericea*, *Alonsoa linearis*, *Senecio calvus*, *S. comosus*, *Tagetes multiflora*, *Satureja elliptica*, *Peperomia rotundata*<sup>2,3,4,5,6,7,8</sup>.

*Baccharis genistelloides* (Asteraceae) habita las zonas andinas de Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile, entre los 3000 y 4000 m.s.n.m, recibe los nombres comunes de “callua callua”, “carqueja”, “karkeja”, “cuchu cuchu”, “kimsa cuchu”, “ischutullma” y es usada para trastornos gastrointestinales, enfermedades reumáticas, fiebre, diabetes, problemas de hígado, cicatrizante de heridas, quemaduras, llagas y ulceraciones, en virtud a que presenta terpenoides, diterpenoides, sesquiterpenos, triterpenoides, aceites esenciales, flavonoides, cumarinas y otras compuestos fenólicos<sup>5,6,7,8</sup>.

Por su lado, *Jungia paniculata* (Asteraceae) es una planta herbácea que habita en los andes peruanos, alrededor de los 2500 a 3000 m.s.n.m, es conocida como “matico” o “caramati”<sup>18</sup> se utiliza para tratar afecciones de la garganta, como antiinflamatoria y antiinfectiva del aparato urinario<sup>18,19</sup>, gracias al efecto de flavonoides, compuestos polifenólicos con efectos antiinflamatorios, antimicrobianos, antivirales, antiulceroso, antioxidante, antihepatotóxico y antihipertensivo que presenta<sup>6,7,8</sup>.

Comúnmente llamada escorzonera, *Perezia multiflora* (Asteraceae) también es una planta herbácea, rizomatoza, postrada, con hojas dentadas, propia de los Andes Peruanos que habita entre 3600 y 3800 m.s.n.m. y los esteroides, alcaloides, saponinas, taninos, aceites esenciales, flavonoides y compuestos fenólicos derivados del catecol la convierten en una planta útil para evitar faringitis y amigdalitis, puesto que los flavonoides (asparaguina) presentes permiten buena acción antiinflamatoria<sup>6,7,8</sup>.

*Senecio sublutescens* es una planta sufrutice; endémica de los departamentos de Ancash y Lima, se la encuentra en condiciones microclimáticas altoandinas a partir de los 4 500 m.s.n.m. no tiene reportes escritos, sin embargo, *S. graveolens* poseen actividad sobre *Micrococcus luteus*, *S. aureus* y *C. albicans*, *S. longipenicillatus* sobre *S. aureus* y *Enterococcus faecalis* y *S. aegyptius* sobre *B. subtilis* y *C. albicans*<sup>2,3,9,10</sup>

La metodología para la selección de plantas en base a la etnobotánica o etnofarmacología selecciona las plantas que son usadas en medicina tradicional y ha demostrado ser la más eficiente y habiéndose encontrado significativa concordancia entre el método de selección etnofarmacológico y químico, siendo los extractos el mod de empleo más frecuente<sup>11,12,13,14,15</sup>. Sin embargo, en muchos países en desarrollo ha ocurrido una pérdida importante del conocimiento tradicional sobre el uso de plantas medicinales; debido a ello, la disponibilidad de éstas se ha visto reducida por la degradación de los bosques y su conversión a bosques secundarios y campos agrícolas<sup>6,8,14</sup>.

La elección del tipo de extracto a preparar dependerá de los objetivos de la investigación; entre ellos se puede citar los extractos acuosos (imitan el uso popular) e hidroalcohólico 50% (para estudios preliminares y porque las sustancias con actividad antimicrobiana pueden ser extraídas con más eficiencia); también se puede emplear una secuencia de varios solventes de diferentes polaridades<sup>6,8,15</sup>. Por ejemplo, empezando con hexano y aumentando la polaridad hasta llegar al acetato de etilo para arrastrar sustancias de polaridad intermedia, terminando con el empleo de alcohol que extrae del vegetal compuestos más polares; este procedimiento ayuda a que la extracción con alcohol arrastre diferentes metabolitos secundarios y de esta forma poder purificarlos más fácilmente<sup>16,17,18</sup>.

A lo largo de la historia, los metabolitos secundarios de las plantas han sido utilizados por la humanidad convirtiéndose en una fuente inagotable de compuestos químicos y complejas sustancias activas, que desde hace muchos años han sido explotadas por el hombre<sup>6,8</sup>. La biosíntesis de metabolitos secundarios suele estar restringida a estados específicos del desarrollo y a periodos de estrés; algunas células vegetales producen metabolitos secundarios importantes en las interacciones de la plantas con el medio ambiente o que están relacionadas con la maquinaria reproductiva de la planta<sup>6</sup>. Los metabolitos



secundarios como derivados de los metabolitos primarios, pero su distribución en el reino vegetal es más limitada y para determinados compuestos queda restringida a ciertas especies e incluso a algunos grupos dentro de una misma especie, por lo tanto es improbable que desarrollen un papel fundamental en el metabolismo primario<sup>18,19</sup>.

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Baccharis genistelloides*, *Perezia multiflora*, *Senecio sublutescens* y *Jungia paniculata* del parque nacional huascarán frente a cepas bacterianas de interés clínico.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Selección del material vegetal

Para hacer la selección de las plantas se utilizó la metodología etnobotánica o etnofarmacológica<sup>29</sup>, que consiste en hacer la búsqueda de bibliografía en textos especializados de investigación etnobotánicos, etnofarmacológicos, fitoquímicos y quimiotaxonómicos de las plantas medicinales existentes en la zona de colecta o en todo caso de las especies cercanas a estas.

### Colecta y preparación del material vegetal<sup>6</sup>

Para la colecta se obtuvo el permiso de colecta otorgado por el Servicio Nacional De Áreas Naturales Protegidas (SERNANP), por tratarse de una Parque Nacional. Las muestras se colectaron durante el mes de junio entre el 10 y 11 del 2012, períodos en los que gran parte de las plantas altoandinas se encuentran en floración y no hay lluvias. Se registraron los datos de ubicación de cada una de las plantas colectadas utilizando un GPS. Solo *Jungia paniculata* fue adquirido en la feria de plantas medicinales de la ciudad de Huaraz. Cuatro ejemplares de cada muestra fueron prensados para su determinación y depósito en el Herbario David Smith de la Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo (Huaraz). La determinación botánica se hizo mediante la técnica de comparación. El material vegetal se lavó con agua corriente, se dejó escurrir y luego se puso a secar en un ambiente oscuro a temperatura ambiental por 3 a 4 meses aproximadamente; luego, se molió a un diámetro de partícula de aproximadamente 2 mm y se almaceno en bolsas herméticamente cerradas a temperatura ambiental.

### Preparación del extracto hidroalcohólico<sup>20</sup>

Se maceró 5g de muestra con 50 ml de una mezcla etanol al 50%<sup>61</sup>. Se dejó por 15 días bajo condiciones de oscuridad, temperatura ambiental de 18 – 25 °C y agitación diaria<sup>33</sup>. Cumplido el tiempo se filtró al vacío sobre papel filtro Whatman N° 1<sup>3</sup>. Los extractos filtrados fueron concentrados en un rotavapor a 40 °C del baño María<sup>33 y 61</sup> y a una presión inicial de 110 mbar. Los extractos concentrados fueron llevados a sequedad en viales de 20 mL de color ámbar estériles en una estufa a 24 °C.

### Preparación de muestras para la microdilución<sup>13</sup>

Se preparó de acuerdo a Tamariz, 1999. Pero duplicando la concentración, para lo cual los extractos secos fueron disueltos con dimetil sulfoxido (DMSO) y agua a una proporción de 4% DMSO y 96% de H<sub>2</sub>O a una concentración final de 100 mg/mL. Ver Anexo N° 2; bajo condiciones de esterilidad utilizando una cámara de Bioseguridad AII vertical. Su almacenamiento se hizo bajo refrigeración a 4 °C.

### Pruebas de actividad antimicrobiana<sup>16</sup>

Se realizó mediante la metodología de microdilución, descrita en el manual de la clinical and laboratory standards institute (NCCLS). De acuerdo esta norma estándar, el inóculo fue preparado como una suspensión directa de colonia (Direct Colony suspensión), bajo la siguiente consideración: El inóculo se preparó a partir de cultivos frescos de 16 horas. Primero se obtuvo una suspensión de 0.08 de DO a 620 nm utilizando un espectrofotómetro, el cual correspondía 1x10<sup>8</sup> CFU/mL. Luego la suspensión fue diluida en caldo MH II (Muller y Hinton II) a una proporción de 1:20 para obtener 5x10<sup>6</sup> CFU/mL. Finalmente se inóculo 10 µl de cepa por cada pozo. El volumen de las diversas diluciones de la muestra fue de 100 µl

por pozo. Los extractos hidroalcohólicos evaluados a las concentraciones de 25, 22.5, 20, 17.5, 15, 12.5, 10, 7.5 y 5 mg/mL. Como blancos se incorporaron blanco de crecimiento y un blanco de muestra, también se preparó un blanco de contaminación. Para todos los casos se prepararon 3 repeticiones. Se usaron placas de microdilución estériles y con tapa marca Costar. Las primeras evaluaciones se realizaron usando las concentraciones iniciales de 25, 20, 15, 10 y 5 mg/mL. De acuerdo a los resultados iniciales se



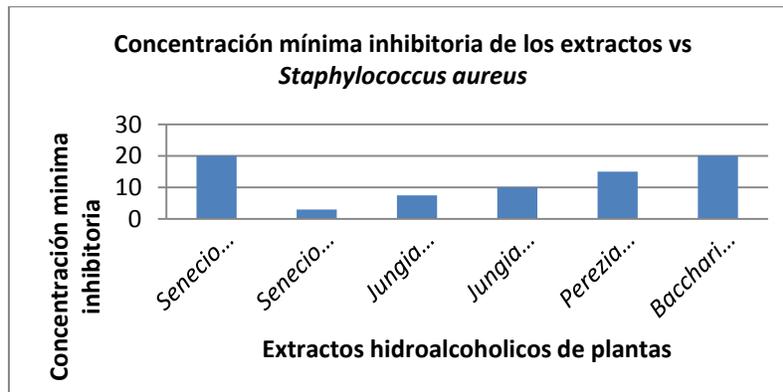
prepararon concentraciones intermedias (23.5, 17.5, 12.5, 7.5 mg/mL) entre la concentración mínima que muestra inhibición y la concentración máxima que muestra crecimiento. Una vez inoculados las microplacas, estas fueron incubadas a una temperatura de 35 °C por 24 horas y la evaluación se realizó mediante la observación del crecimiento bacteriano y se reportó crecimiento e inhibición total para el cálculo de la Concentración Mínima Inhibitoria. Se utilizaron los siguientes microorganismos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Bacillus subtilis* (ATCC 11774).

## RESULTADOS

Se encontró que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de *Senecio sublutescens*, *Jungia paniculata*, *Perezia multiflora* y *Baccharis genistelloides* tuvo actividad antibacteriana solo sobre bacterias Gram positivas (Tabla 1 y Figs. 1 y 2).

**Tabla 1.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), mg/mL, extractos hidroalcohólicos de tallos y hojas de seis especies vegetales de la Reserva Nacional Huascarán (Perú) sobre las cepas de cuatro especies bacterianas de interés clínico.

Especie vegetal	Órgano	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Senecio sublutescens</i>	Tallo	-	-	20	-
<i>Senecio sublutescens</i>	Hoja	-	-	3	10
<i>Jungia paniculata</i>	Hoja	-	-	7.5	15
<i>Jungia paniculata</i>	Tallo	-	-	10	5
<i>Perezia multiflora</i>	Hoja	-	-	15	15
<i>Baccharis genistelloides</i>	Tallo	-	-	20	10



**Fig. 2:** Concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos hidroalcohólicos vegetales (mg/mL) vs *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

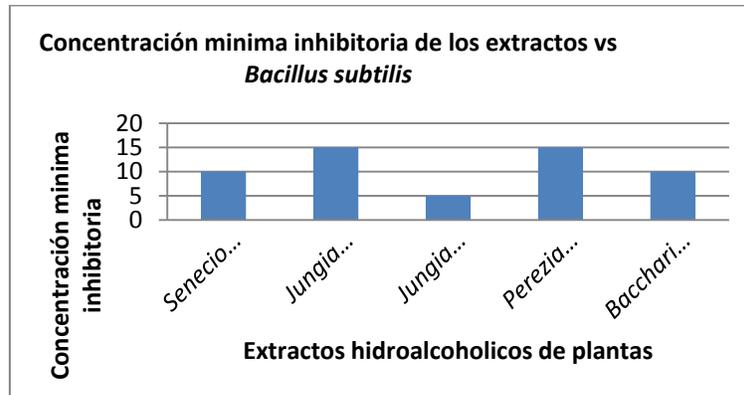


Fig. 3: Concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos hidroalcoolicos vegetales (mg/mL) vs *Bacillus subtilis* ATCC 11774

## DISCUSIÓN

La actividad antibacteriana de *S. sublutescens* con los resultados obtenidos, concuerdan con los resultados reportados para otras especies de *Senecio* por ejemplo la metodología utilizada en este trabajo fue dilución-estrías donde *S. rhizomatus* tuvo actividad antibacteriana sobre *S. aureus* (ATCC 25923) a una CMI de 6387 mg/mL, *Senecio calvus* tuvo actividad antibacteriana sobre *S. aureus* (ATCC 25923) a una CMI de 4000 mg/mL, *S. comosus* tuvo actividad antibacteriana sobre *S. aureus* (ATCC 25923) a una CMI de 4000 mg/mL<sup>2,3</sup>. Las CMI obtenidas por los autores varían significativamente, por el cual no se puede hacer la comparación respectiva por la metodología empleada debido a que los valores obtenidos por este autor fue mucho mayor a la hallada en el presente trabajo.

La metodología utilizada donde se reportó que *S. desiderabilis* presenta actividad antibacteriana sobre *S. aureus* (ATCC 25923) a CMI de 2500 µg/mL indican que su CMI fue menor a lo hallado en este trabajo<sup>3</sup> y de acuerdo a los resultados solo tuvieron efecto sobre *S. aureus* y *B. subtilis* pero no hubo actividad sobre *E. coli* y *P. aeruginosa*, estas dos últimas son bacterias Gram negativas y acorde a la literatura reportada, las Gram negativas son usualmente menos sensibles a los productos naturales que las Gram positivas.

La actividad antibacteriana podría deberse a los efectos separados o sinérgicos de los flavonoides, alcaloides, triterpenos, esteroides, terpenoides, etc reportados para el Género *Senecio*<sup>2,3</sup>. Por ejemplo los terpenoides tienen actividad sobre los microorganismos por que alteran su estructura y función de la membrana citoplasmática y los flavonoides actúan como bacteriostáticos por que inhiben la síntesis del ácido nucleico, dañan la membrana bacteriana e inhiben su metabolismo energético<sup>7,12</sup>.

En el presente trabajo se reportaron las hojas y tallos de *S. sublutescens* donde se observa adicionalmente que la actividad antibacteriana de los tallos solo tuvo efecto sobre *S. aureus* (ATCC 25923) a una CMI de 20 mg/mL mientras que las hojas presentó efecto sobre *S. aureus* (ATCC 25923) y *B. subtilis* (ATCC 11774) a CMI, de 3 y 10 mg/mL, respectivamente. Otra posible razón de esta inhibición se podría decir que se debe a que las hojas acumulan mayores concentraciones de metabolitos secundarios por el cual permite inhibir o reducir el crecimiento de ciertos microorganismo<sup>17,18</sup>.

No hay reportes en la literatura sobre los usos medicinales de *Senecio sublutescens* sin embargo se escogió esta plantas por el reporte de actividad antibacteriana en el Género *Senecio* y también porque es una planta endémica del Perú<sup>6</sup>. La actividad podría estar relacionada a los aceites esenciales observados en hojas y tallos durante el estudio anatómico realizado por Tamariz<sup>1</sup>.

Tanto las hojas y tallos de *J. paniculata* mostraron efecto sobre *S. aureus* (ATCC 25923) y *B. subtilis* (ATCC 11774), donde la hoja tuvo efecto *S. aureus* y *B. subtilis* a una CMI de 7,5 y 15 mg/mL. En el tallo se observó efecto sobre *S. aureus* (ATCC 25923) y *B. subtilis* (ATCC 11774) a unas CMI de 10 y 5



mg/mL respectivamente. Debido que no se han reportado trabajos similares referentes a actividad antimicrobiana en el Género *Jungia* no se pudo hacer la comparación de los resultados obtenidos en este

trabajo. Pero con respecto a los compuestos activos de este género *Jungia* se han identificado flavonoides, compuestos fenólicos que han demostrado efectos antiinflamatorios, antimicrobianos, antivirales, antiulceroso, antioxidante, antihepatotóxico y antihipertensivo<sup>17,18</sup>. En tal sentido, los resultados obtenidos permiten que se encuentre en relación con el uso tradicional de *J. paniculata* en el tratamiento de afecciones respiratorias que en algunas situaciones son causadas por bacterias Gram positivas tales como *S. aureus*, tendría sustento científico<sup>19,20</sup>.

La actividad antibacteriana de la hoja *Perezia multiflora* solo tuvo efecto sobre *S. aureus* (ATCC 25923) y *B. subtilis* (ATCC 11774) a unas CMI<sub>s</sub> de 15 y 15 mg/mL. La actividad antibacteriana de *Perezia multiflora* con los resultados obtenidos concuerda con los resultados reportados para otras especies de *Perezia* por ejemplo *Perezia hebeclada* se trabajó con el método de difusión en discos de papel filtro por el cual tuvo actividad antibacteriana moderada sobre *S. aureus* resistente a la meticilina a CMI de 250 µg/disco del extracto metanólico de raíces y probablemente esta actividad se debió a las cumarinas y terpenoides descritas para esta especie<sup>7,14</sup>. Las CMI obtenidas por este autor es muy diferente a la hallada en este trabajo, por el cual no se puede hacer una comparación por la metodología empleada y el organismo utilizado es más resistente a la empleada en este trabajo.

También se reportó que *P. nudicalis* presenta actividad antifúngica sobre *C. neoformans* (ATCC C13) a una CMI de 0.50 mg/mL<sup>11</sup>. Cabe indicar también que ciertas especies del género *Perezia* tiene actividad sobre hongos, por el cual se podría concluir que este Género *Perezia* tiene actividad sobre un amplio rango de microorganismos bacterias y hongos.

La actividad antibacteriana de parte aérea de *B. genistelloides* solo tuvo efecto sobre *S. aureus* (ATCC 25923) y *B. subtilis* (ATCC 11774) a unas CMI<sub>s</sub> de 20 y 10 mg/mL respectivamente. Parece indicar que el espectro antibacteriano es reducido, limitado solo a gérmenes Gram positivos, no manifestando ser sensibles las bacterias Gram negativo. Los resultados obtenidos en esta investigación se correlacionan con estudios anteriores realizados con otras especies pertenecientes a este género, por ejemplo el método del vertido se aplicó para evaluar a las 24 horas los tratamientos realizados con las concentraciones de 10 000 y 5 000 mg/L, confrontados con *B. subtilis* (ATCC 6633) y *S. aureus* (ATCC 25923), en las cinco especies *Baccharis* tales como *B. teindalensis*, *B. latifolia*, *B. buxifolia*, *B. trinervis* y *B. arbutifolia* obteniéndose un 90% de efectividad en actividad antibacteriana<sup>11,13,14</sup>.

En comparación al trabajo realizado los valores obtenidos de en este trabajo fueron el doble a los encontrados por Verónica y es posible que se deba por la diferente metodología empleada en su trabajo. También se reportó que *B. microphylla*, *B. petiolata* y *B. santelicens* usando la método de difusión agar-disco tuvo actividad antimicrobiana sobre *B. subtilis* (ATCC 6633) a una CMI de 7.8 µg/mL, 62.5 µg/mL y 15.6 µg/mL, pero *Baccharis santelicens* tuvo actividad sobre *S. aureus* (ATCC 25923) a una CMI de 31.2 µg/mL<sup>10</sup>. De acuerdo a los valores reportados por este autor cabe indicar que no se pudo hacer la comparación respectiva a los valores hallados en este trabajo, debido a la diferente metodología empleada y cabe indicar que las especies del género *Baccharis* actúa sobre bacterias Gram positivas. Los componentes responsables de la actividad antimicrobiana en las especies del género *Baccharis* son terpenoides, constituyentes de sus aceites esenciales<sup>4,5</sup>.

## CONCLUSIONES

- Los extractos de tallo y hojas de *Senecio sublutescens* y *Jungia paniculata*, así como de las hojas de *Perezia multiflora* y de *Baccharis genistelloides paniculata*, a la concentración mínima inhibitoria, tiene actividad solamente frente a bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* y no frente a las bacterias Gram negativas



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tamariz C. Estudio de algunas plantas medicinales del Parque Nacional Huascarán, Ancash: pruebas biológicas y fitoquímicas. Tesis de título de Biología. Universidad nacional agraria la Molina. Perú. 1999.
2. Zellagui A, Tijani S, Gherraf N, Rhouti S. Phytochemical screening and evaluation of antibacterial activity of alkaloids extract of *Senecio delphinifolius* Vahl. Scholars Research Library. Der Pharma Chemica 2012; pp.2080-2084.
3. Deuschle R, Camargo T, Francescato L. Actimicrobial activity of *Senecio desiderabilis* vellozo (Asteraceae). Programa de Posgrado en Ciencias e Tecnología Farmacéuticas. Universidad Federal de Santa María 2006; pp.356-359.
4. Rocha R, Hernández M, Lozano P, Hernández B, Santiago. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican plants against methicillin-resistant Staphylococcus. African J Biotech. H. 2011; 10: 13202-13218.
5. Morales G, Paredes A, Sierra P, Loyola L. Antimicrobial activity of three *Baccharis* species used in the traditional medicine of northern Chile. Universidad de Antofagasta-Chile. 2010.
6. Mostacero J, Mejía F. Taxonomía de Fanerógamas Peruanas. 2da ed. Trujillo (Perú): Edit. Libertad. 2002.
7. Suttisri R. y K. Douglas, A. D. 1994. Neo-Clerodane Diterpenes and Other constituents from *Baccharis genistelloides*. Phytochemistry 35(2): 443-446.
8. Villanueva E, San Martín A. Estudio fitoquímico y espectroscópico preliminar de cinco plantas medicinales de Carmen pampa (Coroico) Bolivia. Rev Boliviana Quím 2012; 29(2): 16-23.
9. Tamariz C, Florez M. Estudio anatómico de plantas altoandinas. Adaptaciones morfoanatómicas de *Senecio sublutescens* Cuatrecasas. Arnoldoa 1999; 14: 75-85.
10. Perez C, Agnese A. The essential oil of *Senecio graveolens* (compositae): chemical composition and antimicrobial activity tests. J Ethnopharmacol 1999; 28: 91-96.
11. Rondon M, Araque M, Morales A, Gualtieri, et al. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Lasiocephaltis longipenicillatus* (*Senecio longipenicillatus*). Nat Prod Com 2006; 63: 701-707.
12. Rucker G, Manns D, Shenkel E, Hartmann R, Heinzmann B. Triterpenes with a new 9-epi-cucurbitan skeleton from *Senecio selloi*. Phytochem 1999; 26: 1587-1591.
13. Lizcano A, Vergara J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá D.C. 2008.
14. Ali M, Yaghmour R, Faidi Y, Salem K, Nuri M. Antimicrobial Activity of 20 Plants used in Folkloric Medicine in the Palestinian Area. J Ethnopharmacol 1998; 19: 265-271.
15. Bauer A, Kirby W, Turck M. Antibiotic susceptibility by standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966; 45: 493-496.
16. Thornsberry C. Antimicrobial susceptibility testing: General Considerations. En: Balows A, et al (eds). Manual of Clinical Microbiology. 5ta. Ed. American Society for Microbiology. Washintong DC. 1991; pp.1095-1064
17. Mann C, Markham J. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. J Appl Bacteriol 79: 538- 544.
18. Peñaranda L, Sierra M. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de partes aéreas de las especies *Bursera simanba* y *Bursera graveolens* contra algunos microorganismos patógenos. Facultad ciencias. Básicas. Universidad Javeriana. Bogotá D.C. 2003.
19. Tamariz A, Infantas D, Moreno P. Pruebas fitoquímicas y biológicas de algunas especies de *Senecio* del Parque Nacional Huascarán (Ancash-Perú). Facultad de Ciencias. Universidad Agraria la Molina (Lima, Perú). 1999.
20. Lock U. Investigación Fitoquímica: Métodos para el estudio de productos naturales. 2<sup>da</sup> ed. Lima: Fondo Editorial PUC. 1994.



# Eficacia de la Técnica de Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay con antígenos de Excreción-Secreción de Tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas

## Effectiveness of Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay Technique with excretion-secretion antigens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to Chagas disease diagnose

Olga Sanabria<sup>1</sup> y Hermes Escalante<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, UNT

### RESUMEN

Se estima que aproximadamente 10 millones de personas están infectadas por *Trypanosoma cruzi*, agente productor de la enfermedad de Chagas en América Latina y más de 15 millones de personas están a riesgo de adquirirla. El presente trabajo tuvo como finalidad determinar la eficacia de la Técnica de Elisa con la utilización de antígenos de excreción-secreción de tripomastigotes de *T. cruzi* (TESA) en la detección de anticuerpos específicos. Los tripomastigotes se obtuvieron a partir de epimastigotes de una cepa proveniente Arequipa (Perú), a la cual se le incrementó su biomasa en medio bifásico hasta obtener  $1 \times 10^8$  parásitos/mL durante 15 días, luego fueron cultivados en medio Grace y en Medio de Eagle (Minimum Essential Medium) para la obtención de los TESA. Estos fueron enfrentados con sueros controles para determinar la eficacia de un ELISA-indirecto. Se encontró que la sensibilidad fue del 100% y la especificidad del 95%. Se concluye que la Técnica de ELISA puede ser utilizada a gran escala, por la facilidad de evaluar un número elevado de muestras y obtener resultados automatizados que no dependen de la subjetividad del personal para su interpretación.

**Palabras clave:** Enfermedad de Chagas, ELISA, trpomastigotas, *Trypanosoma cruzi*

### ABSTRACT

An estimated 10 million people are infected with *Trypanosoma cruzi*, producing agent of Chagas disease in Latin America and more than 15 million people are at risk of acquiring it. This study aimed to determine the effectiveness of the Elisa technique with the use of excretory-secretory antigens of trypomastigotes of *T. cruzi* (TESA) in the detection of specific antibodies. The trypomastigotes were obtained from a strain epimastigotes from Arequipa (Peru), which increased its biomass was performing successive cultures in biphasic medium until  $1 \times 10^8$  parasites/mL for 15 days before being cultured in Grace then Eagle's Medium (Minimum Essential Medium) to obtain the TESA. These antigens were confronted with control sera to determine the efficacy of an indirect ELISA technique. A sensitivity of 100 % and a specificity of 95 % was found. It was concluded that the ELISA technique can be used on a large scale, for ease of evaluating a large number of samples and get automated results that do not depend on the subjectivity of staff for interpretation.

Keywords : Chagas disease , ELISA, trpomastigotas , *Trypanosoma cruzi*



## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, enfermedad causada por *Trypanosoma cruzi*, está íntimamente ligada al ámbito rural y a la pobreza de poblaciones del centro y Sudamérica en donde se registran aproximadamente ocho millones de infectados con deterioro progresivo a su salud<sup>1,2,3,4,5</sup>. En el Perú existen alrededor de 600 000 personas infectadas y siete millones en riesgo de adquirirla (34% de la población total), principalmente en la macroregión sur del país (Arequipa, Moquegua, Tacna, Ica, Ayacucho y Apurímac) que está considerada como la principal zona chagásica; sin embargo, también se han reportado casos en la vertiente noreste (La Libertad, Tumbes, Piura) y centro oriental de los Andes (Cajamarca, Amazonas, San Martín y Ucayali)<sup>6,7,8</sup>.

La enfermedad de Chagas posee dos fases sucesivas: aguda, en la que la presentación clínica es confusa, y crónica, que se caracteriza por ser muy duradera y puede pasar por una fase indeterminada, sin presentación clínica; durante la fase aguda o durante una reactivación debido a una inmunosupresión, el diagnóstico se lleva a cabo por detección del parásito circulante, sin embargo en la fase crónica, de baja parasitemia, el diagnóstico es ejecutado por métodos serológicos, dentro de los cuales el ELISA es el más usado debido a su reconocida elevada sensibilidad y especificidad, que dependen del antígeno y el punto de corte usados y de la habilidad para procesar grandes cantidades de muestra rápidamente<sup>3,4,5</sup>.

Un amplio rango de diferentes antígenos han sido usados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, por ejemplo: extractos crudos de epimastigotes sonicados, proteínas extraídas de epimastigotes, epimastigotes completos fijados, amastigotes fijados y sonicados, proteínas recombinantes de *T. cruzi*, y antígenos de excreción/secreción de las formas epimastigotas del protozoo (antígenos ESEA)<sup>9,10,11,12,13,14</sup>; estos últimos han demostrado ser excelentes debido a su elevada sensibilidad y especificidad y a que pueden ser aplicados en diferentes formatos (ELISA, Western blot). Estos excretados/secretados son compuestos específicos porque corresponden a sustancias que el parásito utiliza para su protección y por su naturaleza proteica tienen propiedades antigénicas; además, pueden ser obtenidos en medios de cultivo esencial, como el Eagle-MEM, en cantidades apreciables<sup>15,16,17,18</sup>.

Los ESEA tienen elevada utilidad para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, porque son los que más fácilmente se cultivan *in vitro* y porque se pueden usar en varias técnicas como ELISA<sup>15</sup>, IFI y Western blot; sin embargo, existe la tendencia de utilizar los antígenos de excreción/secreción de los tripomastigotes de *T. cruzi* (TESA), debido a que son igualmente antigénicos y tienen mayor valor en el diagnóstico por que son las formas infectantes naturales<sup>9</sup>.

Teniendo en cuenta que en la actualidad en el Perú esta enfermedad comunicable y de registro obligatorio en todos los Bancos de Sangre y que los kits de Elisa son de fabricación extranjera y utilizan diversos tipos de antígenos de cepas de *T. cruzi* que no proceden de cepas peruanas, resulta pertinente buscar alternativas que permitan mejoras en el diagnóstico. En este contexto, la presente investigación se propuso para responder a la siguiente interrogante: ¿Cuál es la eficacia de la Técnica de Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay “Elisa” con antígenos de Excreción/Secreción de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* obtenidos en medio de cultivo, en la detección de anticuerpos específicos en sueros controles positivos y negativos a la enfermedad de Chagas?

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Antígenos

A partir del cultivo de la Cepa de *T. cruzi* donada por el Laboratorio ESCALABS, se realizaron cultivos hasta aumentar la biomasa, para lo cual se realizó pasos sucesivos en medio bifásico (BHI Y PYLB) enriquecido con 10% de sangre de “conejo” hasta obtener  $1 \times 10^8$  parásitos/ml (el cálculo se estimó mediante el recuento en cámara de Neubauer), aproximadamente a los doce días de cultivo (fase log).

Después de 15 días de incubación, los epimastigotes alcanzaron su fase logarítmica, momento en el cual los epimastigotes fueron lavados con solución buffer fosfato salino (PBS), pH 7.2 por 3 veces mediante centrifugación a 4000 rpm por 5 minutos. Después de ser lavados estos epimastigotes, se sembraron en



medio Grace (Sigma) de acuerdo a las instrucciones de este medio<sup>[33]</sup> y se dejó incubar a temperatura ambiente en una zona oscura por 6 días. Después de este tiempo se tomó una muestra para verificar el proceso de transformación de epimastigotes a tripomastigotes. La identificación de los tripomastigotes se realizó mediante coloración Giemsa.

Los Tripomastigotes cosechados en tubos de 13 x 100 mm se procedieron a lavar 3 veces con PBS estéril (pH 7.2) más antibiótico, se centrifugaron a 4000 rpm por 5 minutos, eliminando el sobrenadante después de cada centrifugación, el sedimento obtenido después de cada lavado se resuspendió hasta llegar a obtener un solo tubo con pellet de *T. cruzi*, luego éste contenido fué lavado dos veces con Minimum Essential Medium (MEM). Luego de los respectivos lavados, el pellet se resuspendió en 3 ml de medio MEM y se incubó a 37°C por 20 horas<sup>19,20</sup>. Después de este tiempo se centrifugó a 4000 rpm x 5 min y se obtuvo el sobrenadante en el cual se encontraron los antígenos de Excreción-Secreción y se guardó a -20°C hasta su posterior uso. La concentración de proteínas se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford<sup>21</sup>.

### Sueros

Se utilizaron 20 sueros positivos a *T. cruzi*, 20 sueros negativos correspondientes a neonatos nacidos en zonas no endémicas y los 40 sueros positivos a otras parasitosis: 12 a Toxoplasmosis, 10 a Leishmaniasis, 08 a Hymenolepiasis, 05 a Cisticercosis y 05 a Hidatidosis. Todos ellos fueron proporcionados por la seroteca del laboratorio ESCALABS de Trujillo

### Ensayo inmunoenzimático (ELISA indirecto)<sup>16,22</sup>

#### • Estandarización de la Técnica de Elisa

##### Dilución óptima del suero (Sensibilización de la Placa)

Partiendo de una concentración de antígeno de 170 ug/mL se realizaron diluciones seriadas de 1/16, 1/32, 1/64, 1/128. De cada una de las diluciones se sensibilizó con 100 uL por pocillo a una placa de poliestireno, posteriormente esta placa se tapó y se incubó a 37°C en cámara húmeda por toda una noche para facilitar la adherencia de los antígenos al poliestireno, material con que están hechas las placas de microtitulación. Al día siguiente la placa fué lavada por tres veces con PBS de pH 7,2 mas Tween 20 a la concentración de 0.5% (PBS-tween 20), y se dejó el líquido de lavado durante 5 minutos en agitación constante.

##### Bloqueo de las zonas reactivas de la placa

Para evitar la adherencia de proteínas inespecíficas en las zonas de los pocillos no cubiertos por los antígenos y que pueden dar lugar a reacciones cruzadas durante el desarrollo de la prueba, se utilizó una solución de leche descremada al 5% a un pH 9,2. Al cual se le agregó 200 ul de solución bloqueadora a cada pocillo y se incubó a 37°C por una hora en cámara húmeda. Posteriormente la solución bloqueadora fué descartada y los pocillos fueron lavados por tres veces con PBS-Tween 20 en agitación constante.

##### Incubación con los sueros

Se empleó diluciones de 1/200, 1/400, 1/800 de un pool de sueros positivos y negativos, se agregó 100 ul de cada una de las diluciones del suero en los pocillos sensibilizados con el antígeno, Las placas fueron tapadas e incubadas a 37°C en cámara húmeda por 1 hora y luego se procedió a lavar por tres veces con PBS- tween 20 en agitación constante. Las placas fueron incubadas a 37°C en cámara húmeda después de haber agregado a cada pocillo 100 ul de conjugado; suero anti Ig.G humana, conjugado con peroxidasa a una dilución de 1/1500; en PBS-tween 20. Posteriormente el conjugado remanente fue eliminado y los pocillos fueron lavados con PBS-tween por tres veces en agitación constante. Finalmente se depositó en cada pocillo 100 uL de sustrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% preparada en buffer citrato a pH 5 más ortofenilendiamina (OPD) como cromógeno el cual luego fue incubado por 10 minutos en un lugar oscuro del laboratorio, luego la reacción fue detenida agregando a cada pocillo 50 ul de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. La densidad óptica de la reacción en cada pocillo fue medida mediante un lector de ELISA a 492 nm de longitud de onda.

#### • Dilución óptima de Antígeno y Congugado

##### Sensibilización de la Placa

Del mismo modo que en el punto 3.2.2.1, partiendo de una concentración de Ag 170 uL se realizaron las mismas diluciones y se sensibilizó la placa con 100 uL por pocillo, para luego ser tapada y llevada a incubación a 37°C en cámara húmeda por toda una noche, al día siguiente la placa fué lavada por tres veces con PBS de pH 7,2 más Tween 20 a la concentración de 0.5% (PBS-tween 20), y se dejó el líquido



de lavado durante 5 minutos en agitación constante. Se realizó posteriormente el bloqueo de las zonas reactivas del mismo modo que en el punto 3.2.1.2.

#### **Incubación con los sueros**

Aquí se empleó una sola dilución, 1/800, de un pool de Sueros positivos, negativos, y otras parasitosis comprobadas. Se agregó 100 ul de la dilución del suero en los pocillos sensibilizados con el antígeno, las placas fueron tapadas e incubadas a 37°C en cámara húmeda por 1 hora y luego se procedió a lavar por tres veces con PBS- tween 20 en agitación constante. Posteriormente las placas fueron incubadas a 37 °C en cámara húmeda después de haber agregado a cada pocillo 100 ul. del conjugado, a las diluciones de 1/1000, 1/1500, 1/2000, 1/2500 en PBS-tween 20. El conjugado remanente fue eliminado y los pocillos fueron lavados con PBS-tween por tres veces en agitación constante. Por último se depositó en cada pocillo 100 ul del mismo sustrato mencionado anteriormente como cromógeno, éste de la misma manera fue incubado por 10 minutos en un lugar oscuro del laboratorio, luego la reacción fue detenida agregando a cada pocillo 50 ul de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M.

#### **Sensibilidad y Especificidad con Sueros Individuales**

Habiendo obtenido la dilución óptima tanto de antígeno como de suero y conjugado, se procedió del mismo modo que en los puntos anteriores pero usando las diluciones óptimas halladas, 1/64 Ag, 1/800 de suero, 1/2500 de conjugado: se usó 20 sueros positivos, 20 sueros negativos a la enfermedad de Chagas y 40 sueros de otras parasitosis. Se sensibilizó la placa con los antígenos de E/S de tripomastigote a la dilución 1/64, se agregó después de la incubación y el lavado como se indica anteriormente, los sueros a la dilución 1/800, y se dejó tres pocillos uno para el control positivo, otro para el control negativo y otro para el blanco (PBS- tween 20 solo). Para luego agregar el conjugado 1/2500, y finalmente el sustrato. Siempre haciendo el lavado correspondiente después de la incubación dada. La densidad óptica de la reacción en cada pocillo fue medida mediante un lector de ELISA a 492 nm de longitud de onda. El punto de corte más óptimo se determinó a partir del promedio de las densidades ópticas de los sueros negativos (sueros negativos y otras enfermedades) más 3 desviaciones estándar.

#### **Determinación del punto de corte, sensibilidad y especificidad<sup>22</sup>**

Para determinar el punto de corte, la especificidad y la sensibilidad se emplearon las fórmulas propuestas para ello.

## **RESULTADOS**

Después de colocar la placa en el lector de ELISA se encontró que las densidades ópticas en los pocillos con sueros positivos fueron mayores que con los sueros negativos y sueros de otras parasitosis (Fig. 1). Los valores hallados luego de restar el valor del Blanco (0.289) y del punto de corte (0.76664458), siguieron siendo mayores en los sueros de chagasicos respecto de los demás (Figs. 2 y 3). Con los datos de la Tabla 1, se encontró una especificidad del 95.0% y una sensibilidad del 100%.

## **DISCUSIÓN**

Las pruebas serológicas constituyen importantes herramientas que permiten estimar los niveles de exposición a *T. cruzi* en regiones endémicas y muchas han sido utilizadas para evaluar medidas de control en Sudamérica<sup>9,10</sup>. A pesar de que existen programas de control, aún no se ha puesto en práctica ningún programa de eliminación del vector, es por eso que se pone en práctica realizar diagnósticos con técnicas altamente sensibles, con la cual pudiera realizar el diagnóstico individual y acometer estudios poblacionales a gran escala que permitieran estimar la diseminación de la enfermedad de Chagas en el país y, más tarde, evaluar los programas de control<sup>3,20</sup>.

En este proyecto la técnica seleccionada fue una prueba de ELISA indirecto, que es una de las técnicas serológicas más sensibles utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en su fase crónica<sup>13,14,15</sup>.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
A	2.769	2.900	2.969	1.191	0.673	0.729	0.913	0.864	0.679	0.747	3.031
B	3.107	3.093	3.106	0.575	0.57	1.039	0.786	0.866	0.474	0.718	0.903
C	2.906	2.899	2.973	0.631	0.646	0.945	0.831	0.661	0.831	0.658	
D	2.906	1.78	3.026	0.633	0.574	0.772	1.114	0.654	0.522	0.742	
E	2.613	2.891	0.496	0.605	0.704	0.753	0.913	0.615	0.489	0.787	
F	3.067	3.075	0.566	0.521	0.581	0.764	0.794	0.653	0.732	0.648	
G	2.97	2.895	0.702	0.604	0.611	0.704	1.047	1.463	0.785	0.524	
H	3.04	3.09	0.635	0.639	0.708	0.744	0.909	0.827	0.693	0.905	0.289

Fig 1. Densidades ópticas en los resultados de ELISA utilizando antígenos de excreción-secreción de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* y sueros individuales con pacientes positivos (color amarillo), negativos a la enfermedad de Chagas (verde) y pacientes con otras parasitosis: toxoplasmosis, leishmaniasis, himenolepiasis, cisticercosis e hidatidosis (blanco).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
A	2.48	2.619	2.68	0.902	0.384	0.44	0.624	0.575	0.39	0.458	2.742
B	2.818	2.804	2.817	0.286	0.281	0.75	0.497	0.577	0.185	0.429	0.614
C	2.617	2.61	2.684	0.342	0.357	0.656	0.542	0.372	0.542	0.369	
D	2.697	1.491	2.737	0.344	0.285	0.483	0.825	0.365	0.233	0.453	
E	2.324	2.602	0.207	0.316	0.415	0.464	0.624	0.326	0.2	0.498	
F	2.778	2.786	0.277	0.232	0.292	0.475	0.505	0.364	0.443	0.359	
G	2.681	2.606	0.413	0.315	0.322	0.415	0.758	1.174	0.496	0.235	
H	2.751	2.801	0.346	0.35	0.419	0.455	0.62	0.538	0.404	0.616	

Fig 2. Densidades ópticas en los resultados de ELISA utilizando antígenos de excreción-secreción de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* y sueros individuales con pacientes positivos (color amarillo), negativos a la enfermedad de Chagas (verde) y pacientes con otras parasitosis: toxoplasmosis, leishmaniasis, himenolepiasis, cisticercosis e hidatidosis (color blanco), después de restar el valor del Blanco (0.289).

Tabla 1. Relación entre el resultado de la prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de una enfermedad

Positivo	20	3	23
Negativo	0	57	57
TOTAL	20	60	80

Cut off 3D 0.76664



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
A	1.713355	1.85235542	1.91335542	-0.13535542	-0.38264458	-0.32664458	-0.14264458	-0.19164458	-0.37664458	-0.30864458	1.97535542
B	2.051355	2.03735542	2.05035542	-0.48064458	-0.48564458	-0.01664458	-0.26964458	-0.18964458	-0.58164458	-0.33764458	-0.15264458
C	1.850355	1.84335542	1.91735542	-0.42464458	-0.40964458	-0.11064458	-0.22464458	-0.39464458	-0.22464458	-0.39764458	
D	1.930355	0.72435542	1.97035542	-0.42264458	-0.48164458	-0.28364458	0.05835542	-0.40164458	-0.53364458	-0.31364458	
E	1.557355	1.83535542	-0.55964458	-0.45064458	-0.35164458	-0.30264458	-0.14264458	-0.44064458	-0.56664458	-0.26864458	
F	2.011355	2.01935542	-0.48964458	-0.53464458	-0.47464458	-0.29164458	-0.26164458	-0.40264458	-0.32364458	-0.40764458	
G	1.914355	1.83935542	-0.35364458	-0.45164458	-0.44464458	-0.35164458	-0.00864458	0.40735542	-0.27064458	-0.53164458	
H	1.904355	2.03435542	-0.42064458	-0.41664458	-0.34764458	-0.31164458	-0.14664458	-0.22864458	-0.36264458	-0.15064458	

Fig 3. Densidades ópticas en los resultados de ELISA utilizando antígenos de excreción-secreción de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* y sueros individuales con pacientes positivos (color amarillo), negativos a la enfermedad de Chagas (verde) y pacientes con otras parasitosis: toxoplasmosis, leishmaniasis, hymenolepiasis, cisticercosis e hidatidosis (color blanco) después de restar el valor del punto de corte 0.76664458.

La determinación de la especificidad de la Técnica de ELISA utilizando 20 sueros positivos a la enfermedad de Chagas, 20 sueros negativos a la misma y 40 sueros de otras parasitosis se considera adecuado, porque corresponde a un número suficiente para este tipo de exámenes. En otras investigaciones se ha usado números de sueros similares<sup>9,11,14</sup>, aun cuando debe tenerse en cuenta que para investigaciones seroepidemiológicas el número de sueros usados es mayor<sup>10,17</sup> y ello tiene su base en que, precisamente, el diseño de un ELISA es para procesar gran número de muestras, pero la validez se prueba siempre con menor cantidad, como ha sucedido en la presente investigación.

La estandarización de la Técnica de ELISA es un paso inicial y el más importante, porque se busca hallar la concentración óptima de antígeno a utilizar, la dilución óptima de suero y conjugado, que son la base para la generación y confección de los kits comerciales<sup>14</sup>. Entonces, el uso de antígenos de excreción/secreción de *T. cruzi* resulta adecuado y recomendable porque se ha verificado que éstos inducen una elevada respuesta inmune humoral, generándose anticuerpos que poseen una especificidad tan precisa capaz de distinguir entre diferentes cepas de una misma especie o entre diferentes estadios evolutivos del mismo parásito<sup>9,15</sup>. Lógicamente, si se usa otros tipos de antígenos u otras concentraciones se obtendrán distintos resultados; sin embargo, en caso de proponerlo a gran escala debe precisarse para que los laboratorios tengan una adecuada información cuando elijan uno u otro, para diagnóstico o investigación<sup>16</sup>. En concordancia con ello, se considera que los antígenos usados en la presente investigación constituyen adecuados para el uso de la técnica de ELISA, bajo cualquiera de sus formatos, pues la dilución y el punto de corte encontrados así lo demuestran.

Utilizando la fórmula dada se halló un 100% de sensibilidad de esta Técnica con un 95% de especificidad, la concordancia de los resultados obtenidos fue la esperada, y se puede comparar la sensibilidad y especificidad de la prueba con otros estudios que utilizaron inmunoensayos enzimáticos semejantes. El 100% de sensibilidad es un resultado comparable a casi todos los ELISA<sup>14,15,16</sup> ya que la técnica tiene como mayor propiedad ello, aspecto que está relacionado con el hecho de que ELISA, por la reacción enzima-sustrato, potencia la reacción antígeno-anticuerpo, mas bien el 95 de especificidad, aun cuando es comparable a lo encontrado en otras investigaciones<sup>16,17</sup>, podría mejorarse un poco proponiendo dos dígitos en el punto de corte y con ello sacar ventajas de otros antígenos usados, aspecto que tiene que ver con las reacciones cruzadas, principalmente con infecciones por *Leishmania* spp.<sup>17</sup>.

Comparando nuestros resultados con otras investigaciones realizadas, en el caso de la prueba de IFI, ésta es igual de sensible y específica que la Técnica de ELISA pero tiene un número de limitaciones



prácticas, especialmente debido a la subjetividad de la interpretación de resultados, al requerimiento de personal altamente calificado y con experiencia para diferenciar los casos positivos de los negativos<sup>14,15,16</sup>. Por lo contrario, estudios indican que la prueba de Western Blot es menos sensible que la Técnica de Elisa, pero más específica ya que esta se basa en la detección sólo de proteínas específicas<sup>[46]</sup>.

## CONCLUSIÓN

- La Técnica de Enzyme Linked Immuno- Sorbent Assay “Elisa” con antígenos de Excreción/Secreción de tripomastigotes de *T. cruzi*, cepa “CH”, obtenidos en medio GRACE es eficaz en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, con una sensibilidad de 100 % y una especificidad de 95 %, observándose reacciones cruzadas sólo con sueros de pacientes con Leishmaniasis.

## RERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Rev Inst Med Trop*, 2007; 102: 75-85.
2. Carod-Artal FJ, Gaseon J. Chagas disease and stroke. *Lancet Neurol*, 2010; 9: 533-542
3. Kowalski A, Kowalski P, Torres TMA. Chagas disease-American tripanosomiasis. *Pol Ann Med*, 2011; 18(1): 156-167
4. Teixeira ARL, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, et al. Pathogenesis of Chagas disease: parasite persistence and immunity. *Clin Microbiol Rev*, 2011; 24(3): 592-630
5. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, et al. Current understanding to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Sem Immunopathol*, 2012; 34: 753-770
6. Bayer AM, Hunter GC, Gilman RH, Cornejo del Carpio JG; et al. Chagas disease, migration and community settlement patterns in Arequipa, Peru. *PLoS Negl Trop Dis*, 2009; 3(12): e567
7. Hunter GC, Barroni-Mayori K, Juarez JA, Neyra RC, et al. A field trial of alternative target screening strategies for Chagas disease in Arequipa, Peru. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012; 6(1): e1468
8. Chiarpenello J. Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana). *Evid Actual Pract Ambul*. 2004; 7: 114-9
9. Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, Gottschalk M, et al. Purified excreted-secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tool from diagnosis of Chagas disease. *J Clin Microbiol*, 2006; 44(2): 291-296
10. Berrizbeitia M, Aguilera G, Ward B, Rodríguez J, Jorquera E, Ndao M. Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en la población rural de Miraflores, estado Monagas. Estabilidad y diferencia de reactividad de epimastigotes fijados. *Rev Soc Ven Microbiol*, 2010; 30(1): 1-5.
11. Nakasawa M, Rosa DS, Pereira VRA, Moura MO, et al. Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas disease. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001; 8(5): 1024-1027
12. Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine crossreactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin Vacc Immunol*, 2007; 14(8): 1045-1049.
13. Zicker F, Smith PG, Luquetti AO, Oliveira OS. Detección de infectados por *Trypanosoma cruzi* mediante inmunofluorescencia, ELISA y hemaglutinación en suero y eluidos de sangre seca. *Bol Of Sanit Panam* 1991; 110: 489-496.
14. Brasil PE, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangernis LHC, Braga JV. ELISA vs PCR from diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*, 2012; 10: 337
15. Berrizbeitia M, Figueroa M, Ward BJ, Rodriguez J, et al. Development and application of an ELISA assay using excretory/secretory proteins from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* (ESEA antigens) for the diagnosis of Chagas disease *J Trop Med*, 2012; 2012: 875909
16. Santos LS, Torres RM, Machacado de Asis GF, Bahia MT, et al. In house ELISA method analyzes anti-*Trypanosoma cruzi* reactivity for differential diagnosis and evaluation of Chagas disease morbidity. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2012; 45(1): 35-44
17. Figueredo-Silva J, Kaneda Y, Tachibana H, Furushima R, Tateno S, Correia-Lima FG, et al. Epidemiological survey of *Trypanosoma cruzi* infection in north-eastern Brazil using different diagnostic methods. *Rev Med Inst Trop São Paulo*, 1991; 33:193-198.
18. Gazzinelli RT, Galvao LM, Cardoso JE, Cancado JR, Kretti AU, Brener Z, et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-laminin antibodies in chagasic patients after specific treatment. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1795-1800.
19. Eagle H. myo-Inositol as an Essential Growth Factor for Normal and Malignant Human Cells in Tissue Culture. *J Biol Chem*, 1956; 214: 845-847



20. Vega S, Náquira C. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la Trypanomiosis americana (Enfermedad de Chagas). 2da ed. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2006.
21. Bradford, MM (1976), Método rápido y sensible para la cuantificación de cantidades de microgramos de proteína utilizando el principio de la proteína de unión a colorante. *72* :248-254, doi : 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
22. Afonso AM, Ebell MH, Tarleton RL. A systematic review of high quality diagnosis test for Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012; 6(11): e1881.



# Antígenos del líquido seudocelómico de *Ascaris suum* detectados por Western Blot utilizando IgY producidos en *Gallus gallus* var. Hisex Brown

## Seudocelomic fluid antigens of *Ascaris suum* detected by Western Blot technique using IgY produced in *Gallus gallus* var. Hisex Brown

Mario D. Arteaga-García<sup>1</sup> y Cesar A. Jara<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tesista de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. <sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

### RESUMEN

La técnica de Western blot está siendo cada vez más usada en el diagnóstico de enfermedades parasitarias y la búsqueda de fuentes antigénicas para su aplicación constituye un campo de interés creciente. El presente trabajo estuvo orientado a identificar los antígenos en líquido seudocelómico (LS) de *Ascaris suum*, mediante la técnica de Western Blot utilizando IgY producidos en *Gallus gallus*. El LS se obtuvo de ejemplares hembras que fueron extraídas directamente del intestino de cerdos naturalmente infectados y sacrificados en el Camal Municipal de El Porvenir (Trujillo, Perú), el cual se utilizó para inmunizar, junto con el adyuvante completo e incompleto de Freud, a un ejemplar de *G. gallus* Hisex Brown, a fin de obtener IgY contenida en la yema de huevo. En el LS tratado con dithiothreitol (DTT) se encontró 12 bandas antigénicas, cuyos pesos moleculares fueron: 101.0, 94.9, 65.0, 61.1, 50.6, 45.0, 41.5, 34.6, 22.4, 16.3, 14.4 y 12.7-10.5 kDa; mientras que en el LS no tratado con DTT se encontraron 15 bandas antigénicas, cuyos pesos moleculares fueron: 101.0, 94.9, 65.0, 61.1, 50.6, 45.0, 41.9, 34.6, 27.0, 25.4, 21.5, 18.5, 16.3, 14.4 y 11.2 kDa. Se concluye que el LS de *Ascaris suum* es una buena fuente de proteínas antigénicas que podrían utilizarse en el diagnóstico de la ascariasis pulmonar.

**Palabras clave:** *Ascaris suum*, líquido seudocelómico, Western blot.

### ABSTRACT

The Western blot technique is being increasingly used in the diagnosis of parasitic diseases and search for antigenic sources for application is a field of growing interest. The present study was designed to identify the antigens in pseudocelomic fluid (SF) of *Ascaris suum* by Western blotting technique using IgY produced in *Gallus gallus*. The SF was obtained from female specimens recollected directly from the intestine of naturally infected pigs slaughtered in the El Porvenir (Trujillo, Peru) Municipal Slaughterhouse. SF was used to immunize, with complete and incomplete Freud's adjuvant, to one specimen of *G. gallus* Hisex Brown, to obtain IgY contained in the egg yolk. In LS treated with dithiothreitol (DTT) was found twelve antigenic bands, whose molecular weights were: 101.0, 94.9, 65.0, 61.1, 50.6, 45.0, 41.5, 34.6, 22.4, 16.3, 14.4 and 12.7-10.5 kDa, while in the LS not treated with DTT were found fifteen antigenic bands, whose molecular weights were: 101.0, 94.9, 65.0, 61.1, 50.6, 45.0, 41.9, 34.6, 27.0, 25.4, 21.5, 18.5, 16.3, 14.4 and 11.2 kDa. It was concluded that the *Ascaris suum* LS is a good source of protein antigens that could be used in the diagnosis of pulmonary ascariasis.

**Keywords:** *Ascaris suum*, pseudocelomic fluid, Western



## INTRODUCCIÓN

La ascariasis constituye una de las infecciones más frecuentes en comunidades donde la pobreza prevalece, las implementaciones de salubridad son deficientes y la educación adecuada sanitaria no ocupa un lugar preferente en el desempeño diario, con efectos negativos tales como: desnutrición, falta de crecimiento pondoestatural, deficiencias cognitivas e inmunológicas que conducen a procesos de asma y susceptibilidad a infecciones producidas por *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis* y el virus de la inmunodeficiencia adquirida<sup>1,2,3</sup>. La prevalencia global de infección por *Ascaris* es de 1.4 billones y en el Perú, entre el 06 y 98%, con mayores porcentajes en poblaciones infantiles de la selva y ceja de selva<sup>4,5</sup>.

*A. suum* es uno de los parásitos más prevalentes en cerdos domésticos y es el único helminto frecuente en sistemas de producción masiva, las infecciones son más frecuentemente diagnosticadas por la presencia de las formas adultas en el intestino delgado en mataderos o por el hallazgo de los típicos huevos en muestras de materia fecal. Ambos métodos han sido ampliamente usados en estudios de prevalencia y han proveído información directa e indirecta, respectivamente, de la presencia de las formas adultas en el intestino delgado; sin embargo, no proveen información respecto del porcentaje de individuos que han experimentado infecciones pasadas o de los que tienen las larvas en fase migratoria<sup>6,7,8</sup>.

La ascariasis pulmonar es producida tanto por *A. lumbricoides* como por *A. suum* y está relacionada con la ruptura de los capilares y de las paredes de los tabiques alveolares por las L3 y L4 con la presentación de diversas patologías directas e indirectas<sup>9,10,11</sup>. Su diagnóstico se establece por la detección de anticuerpos o antígenos habiéndose empleado diversas técnicas, siendo ELISA la más frecuentemente utilizada, aunque, debido a su poca especificidad se está tratando de ser reemplazada o complementada con la técnica de Western Blot utilizando antígenos de excreción-secreción de las formas adultas o formas larvarias pulmonares<sup>12,13</sup> o del líquido seudocelómico<sup>14</sup>.

Sin embargo, la obtención de anticuerpos en conejo para la técnica de Western blot trae consigo algunas dificultades relacionadas con el tiempo, el costo en manutención del animal y la muerte durante el sangrado. Ello condujo al uso de las inmunoglobulinas presentes en la yema de huevo de gallina (IgY) que, además, funcionalmente no interactúan con factores reumatoideos, de tal manera que la probabilidad de dar falsos-positivos en ensayos inmunoquímicos disminuye; no se unen a la proteína A estafilocócica ni a la proteína G ni al sistema de complemento humano y reconocen de preferencia proteínas de alto peso molecular (entre 46 y 77KDa); esto evidencia la ventaja de utilizar gallinas, las cuales proveen un repertorio de anticuerpos útiles, abundantes y baratos<sup>15,16</sup>.

En el presente informe se presentan los resultados de una investigación a determinar los antígenos del líquido seudocelómico de *A. suum* detectados por Western Blot utilizando IgY producidos en *G. gallus* var. Hisex Brown, de tal manera que sirva de base y sustento para el desarrollo de técnicas de diagnóstico para la ascariasis pulmonar en humanos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Obtención de formas adultas de *A. suum*

Ejemplares de *A. suum* fueron extraídos directamente del intestino de cerdos naturalmente infectados y sacrificados en el Camal Municipal de El Porvenir (Trujillo-Perú) e inmediatamente colocados en un frasco con solución salina fisiológica (SSF) tibia, previo lavado para eliminar la materia orgánica, y trasladadas al laboratorio de Helminología Parasitaria de la Universidad Nacional de Trujillo. Se diferenciaron las hembras de los machos por su tamaño y forma terminal de la cola.

### Obtención del Líquido Seudocelómico de *A. suum* y determinación de la concentración de proteínas

Los 15 ejemplares hembras de *A. suum* fueron lavadas cuatro veces con SSF estéril y una con SSF más antibióticos (Gentamicina 0.5 ml/ 100 mL y Penicilina G sódica 0.5 mL/ 100 mL de 1,000,000 UI);



luego en condiciones de esterilidad y con la ayuda de una tijera estéril se procedió a realizar un corte en la parte final de la cola del parásito y de esta manera se recolectó el líquido pseudocelómico (LS) en un frasco estéril; el cual fue conservado en refrigeración a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta ser utilizado. Posteriormente, fue centrifugado a 10,000 rpm por 10 minutos, luego se eliminó el sedimento y se utilizó el sobrenadante para determinar la concentración de proteínas por el método colorimétrico de Bradford<sup>17</sup>.

### **Inmunización de *G. gallus* y Obtención de Anticuerpos IgY<sup>15</sup>**

Para la obtención de anticuerpos, el LS fue inoculado en cuatro ocasiones, cada siete días, a un ejemplar de *G. gallus* var. Hisex Brown, hembra, por vía subcutánea; la primera inoculación se realizó mezclando 1 mL de adyuvante completo de Freund (que favorece el depósito del antígeno en el sitio de inoculación y potencia la inmunogenicidad) con 1 mL de LS a una concentración de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (dilución de 0.09 mL del LS con 3.91 mL de SSF), esta concentración fue obtenida teniendo en cuenta el resultado de la medición de proteínas por el método de Bradford; los componentes fueron depositados en un frasco de penicilina estéril colocado sobre un depósito con hielo y la emulsión fue obtenida de la agitación de ambos, a la mezcla se le consideró óptima cuando el agua ya no la dispersaba; ya obtenida la emulsión se procedió a la inmunización, para la segunda, tercera y cuarta inoculación también se obtuvo una emulsión, pero con 1 mL de adyuvante incompleto de Freund y de 1 mL antígeno.

En efecto, se utilizaron los huevos obtenidos del ejemplar cuatro días previos a la primera inoculación (para usarlos como controles negativos) y los recolectados post cuarta inoculación hasta el noveno día (30 días posteriores a la primera inoculación), esto debido a que los anticuerpos aparecen a partir de la segunda o tercera semana después de iniciada la inmunización y se mantienen constantes y elevados hasta la doceava semana. Para ello, primero, se liberó a la yema de la ovoalbúmina y de la membrana que la recubría, manualmente; luego se les pesó por separado y se les agregó el doble de volumen de PBS estéril a  $1 \times 0.01\text{M}$ , pH 7.2 y homogeneizó cuidadosamente; e inmediatamente, 5 mL del homogeneizado se colocó en tubos de ensayo y se agregó 5 mL de cloroformo en constante agitación, luego se dejó en reposo durante una hora para, finalmente, centrifugar a 4500 rpm, por 15 minutos, obteniendo una solución con tres fases de las que se separó el sobrenadante, y en donde se hallaron los anticuerpos requeridos; este sobrenadante fue conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **Técnica de Western Blot<sup>18</sup>**

La ejecución de la técnica de Western Blot y la preparación de los reactivos se efectuó siguiendo las indicaciones sugeridas por Escalante y col<sup>32</sup>, con las siguientes particularidades: (i) los antígenos de LS fueron preparados a las concentraciones de 0.025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y 0.05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , una parte de estas concentraciones de Líquido Seudocelómico fueron tratadas con Dithiothritol (DTT), 0.1% de dodecil sulfato de sodio (SDS), 6% de glicerol y 0.025% de azul de bromofenol y las partes restantes se prepararon sin DTT; luego, se calentó a  $65^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos, dejándose enfriar a temperatura de laboratorio ( $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) antes de su uso. (ii) la SPS-PAGE se realizó a la concentración del 15% de acrilamida del gel separador y al 3% del gel concentrador, colocando 15  $\mu\text{L}$  de antígeno en cada uno de los pocillos del gel concentrador, a 60V en el gel de apilamiento por 10 minutos y a 200V en el gel separador por 50 minutos, hasta que el colorante trazador, azul de bromofenol, alcanza el extremo inferior del gel, (iii) la transferencia se hizo en una cámara de electroforesis horizontal (TRan- Blot Cell, Bio Rad) a 100V por espacio de dos horas y a  $4^{\circ}\text{C}$ , utilizando un buffer de transferencia constituido por 0.2 mL Tris/HCL pH 8; 20% de metanol y agua destilada y (iv) los pesos moleculares se determinaron por comparación con el marcador de bajo peso molecular conocido (Low Range, Ewigh Standard; Bio Rad), el cual incluye las siguientes proteínas: Fosforilasa b (97.4 KDa), albúmina sérica (66.2 KDa), ovo albúmina (45.0 KDa), anhidrasa carbónica (31.0 KDa), inhibidor de la tripsina (21.5 KDa) y lisozima (14.4 KDa); de esta manera se determinó el peso molecular relativo de los antígenos, para lo cual se encontró la movilidad relativa (Rf) del marcador y de los antígenos en estudio.



## RESULTADOS

Del Líquido seudocelómico de 15 ejemplares hembras que fue centrifugado a 10,000 rpm por 10 minutos, se obtuvo 7.5 mL de sobrenadante, el cual tuvo una concentración de proteínas de 10,700  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Los pesos moleculares de las proteínas de *A. suum* obtenidas a las concentraciones de 0.05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y 0.025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y tratadas con DTT fueron: 101.0, 94.9, 65.0, 61.1, 50.6, 45.0, 41.5, 34.6, 22.4, 16.3, 14.4, 12.7-10.5 KDa; mientras que, los pesos moleculares de las proteínas a las concentraciones de 0.05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y 0.025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  que no se trataron con DTT fueron: 101.0, 94.9, 65.0, 61.1, 50.6, 45.0, 41.9, 34.6, 27.0, 25.4, 21.0, 18.5, 16.3, 14.4, 11.2 KDa. (Fig 1)

## DISCUSIÓN

La utilización de *G. gallus* como modelo experimental para la producción de anticuerpos anti-antígenos de Líquido Seudocelómico de ejemplares hembras de *A. suum* representa una alternativa interesante para la obtención de anticuerpos a partir de la yema de huevo; debido a que la ventaja de este método es que una vez inmunizada la gallina se cuenta con una fuente consistente de anticuerpos frescos durante todo el ciclo de postura del animal; esto debido a que el comportamiento inmunológico de las aves es más uniforme que el de los mamíferos (conejos, cobayos, etc); porque siempre muestran niveles relativamente elevados de anticuerpos para el caso de inmunógenos peptídicos, lo cual ha sido comprobado por otros autores, por lo tanto esto representa una manera práctica y económica para la obtención de anticuerpos<sup>15,16</sup>.

El volumen de antígenos depende del tamaño y cantidad del parásito, cuando se utilizan como fuente larvas para obtener productos de excreción-secreción se requiere miles de larvas, mientras que al usar las formas adultas se requiere de menor cantidad; sin embargo, la cantidad producida es escasa; frente a esto el uso de líquido seudocelómico resulta ventajoso, porque, se necesitan pocos ejemplares adultos y se obtiene una mayor cantidad de volumen<sup>34</sup>. Otro aspecto a mencionar, es que los productos de excreción-secreción necesitan de un medio mínimo esencial, una incubadora, la cantidad de tiempo en el que se dispone y por último la sonificación con un sonicador para la obtención de los antígenos totales; por el contrario el líquido seudocelómico se obtiene como tal y solo se requiere centrifugar<sup>15,16</sup>.

La inmunización se realizó por medio de la vía subcutánea teniendo en cuenta estudios anteriores donde se compararon la producción de anticuerpos al realizar inmunizaciones tanto en vía subcutánea como por vía intramuscular, en donde demostraron que no existen diferencias entre estas vías de inmunización<sup>20,21,22</sup>.

Se utilizó el adyuvante completo de Freund en la primera inmunización, y el adyuvante incompleto de Freund en las tres restantes para potenciar la inmunogenicidad de la gallina durante la inmunización experimental<sup>21, 22</sup>. De esta manera se hace más efectiva la respuesta inmune, asegurando un mayor nivel de producción de anticuerpos específicos para obtener buenas lecturas en el resultado<sup>23</sup>.

La IgY es una inmunoglobulina presente en cantidades significativas en la yema de huevo; estas proteínas son transportadas desde el suero durante la maduración de la yema en el oviducto por un mecanismo similar a la transferencia placentaria que ocurre en los mamíferos; esto resulta en mayores concentraciones de IgY en la yema que en el suero de la gallina; las ventajas del uso de la IgY frente a la IgG, es que no producen daño en el animal para su formación y es de fácil extracción debido a que se encuentran en mayor cantidad que otras proteínas en la yema, entonces no es necesario el uso de sulfato de amonio para precipitar las proteínas<sup>36</sup>. El método de deslipidación empleado es eficiente debido a que no produce daño alguno sobre las proteínas, tampoco requiere ambientes exigentes porque el volumen empleado de cloroformo es bajo<sup>15,16,19</sup>.

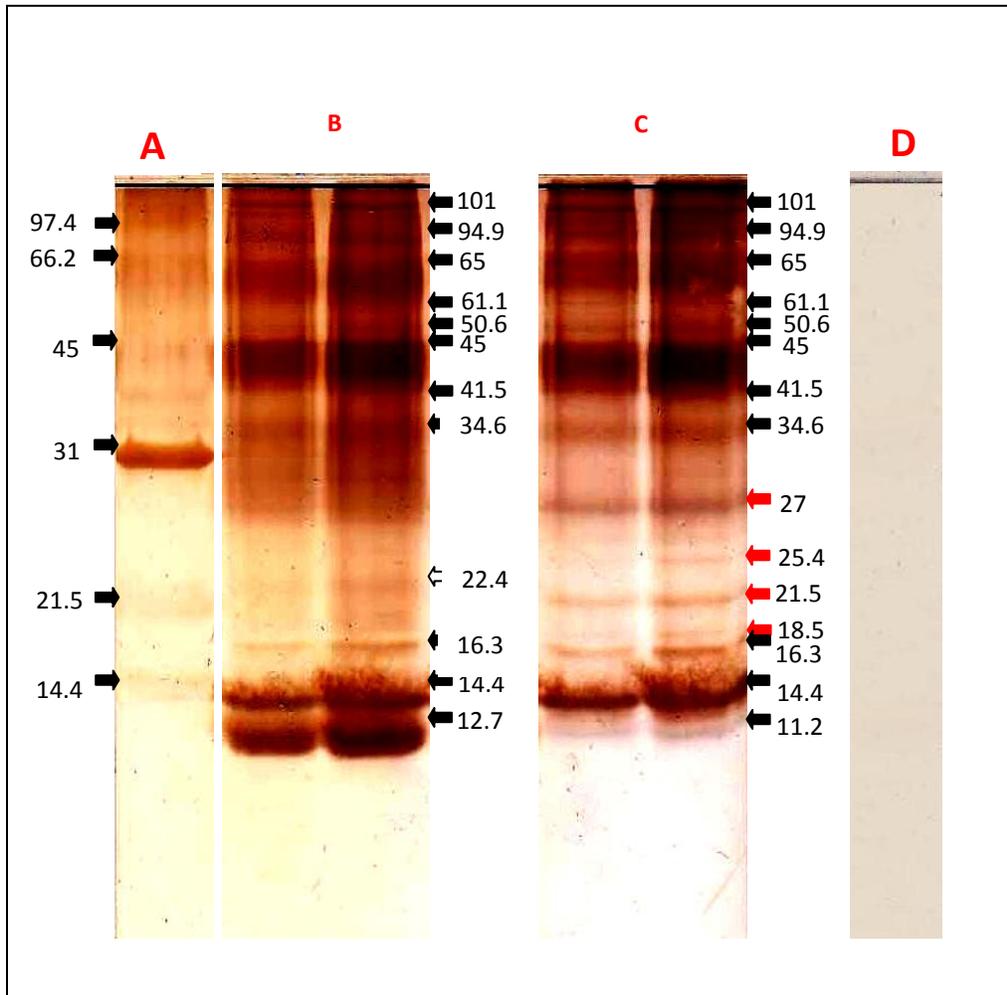


Fig 1. Pesos moleculares de bandas antigénicas del líquido seudocelómico (LS) de ejemplares hembras de *Ascaris suum* detectadas por IgY producidas en *Gallus gallus* Hisex Brown mediante la técnica de Western Blot.

A: PM (kDa)

B: suero hiper-inmune + LS tratado con Dithiothreitol (DTT)

C: suero hiper-inmune + LS sin tratar con Dithiothreitol (DTT)

D: suero pre-inmune (control)

La técnica de Western Blot tiene elevada sensibilidad (93%), porque detecta los complejos antígenos-anticuerpos mediante la técnica de Elisa; y también presenta elevada especificidad (100%) debido a que fracciona los componentes proteínicos del antígeno<sup>37, 38</sup>. Debido a estas razones, esta técnica ha sido utilizada para determinar los antígenos producidos de varios helmintos como por ejemplo: *Taenia solium*<sup>18</sup>, *Toxocara canis*<sup>20</sup>, *Cysticercus tenuicollis*<sup>16</sup>, *Hymenolepis nana*<sup>21</sup> y *Fasciola hepatica*<sup>23</sup>.

Se utiliza SDS (duodecil sulfato) que es una sal sódica que se une a las proteínas y les confiere carga negativa, betamercaptoetanol que reduce cualquier puente disulfuro, glicerol que aumenta la densidad y ayuda a mantener estable la muestra, y azul de bromofenol que es el marcador y tiene movilidad superior a las proteínas de la muestra, se utiliza como marcador del frente de la electroforesis, que en principio garantiza que por detrás se encuentren las proteínas e indica cuando se debe de interrumpir la electroforesis<sup>24</sup>.

El líquido seudocelómico fue sometido a un tratamiento con un agente reductor, Dithiothreitol (DTT), de puentes disulfuro; esto con la finalidad de desnaturalizar las proteínas y transformar las



estructuras complejas en estructuras simples. Sin embargo al procesar las proteínas del Líquido pseudocelómico sin DTT se obtuvo bandas mejor definidas que las bandas del líquido pseudocelómico con DTT; esto significa que los antígenos del Líquido pseudocelómico del parásito son mayormente proteínas simples<sup>23</sup>. La evidencia ausencia de algunas de las bandas antigénicas al utilizar las mismas concentraciones puede deberse a la acción desnaturizante del DTT, ya que afecta a las proteínas, exponiendo sus epitopes, para facilitar su interacción con los anticuerpos, teniendo como consecuencia la aparición de nuevas bandas, o simplemente pueden alterar los epitopes de las proteínas y por ende desaparecer la banda antigénica al ser revelada<sup>16</sup>.

De las bandas determinadas, algunas de ellas han sido detectadas o están estrechamente relacionadas con otras investigaciones. El antígeno de peso molecular 14.4 KDa es una proteína compartida con *A. lumbricoides* ya sea utilizando la forma adulta o el extracto de sus órganos reproductores como fuente de antígenos<sup>14</sup>, o bien estrechamente relacionada con el antígeno 14.9 KDa presente en las larvas pulmonares<sup>21</sup>. Sin embargo no es una proteína específica de *A. suum* porque se le ha detectado también en investigaciones realizadas con *Toxocara canis* (14.1 KDa)<sup>20</sup>. La banda de 16.3 KDa es similar a la de 16KDa presente en el estadio larvario tres, para la cual se ha creado un recombinante AS16 reportándose como protector contra la migración de L3<sup>13</sup>. Las proteínas de 21.5, 50.6 KDa coinciden con otra investigación donde se ha trabajado con extractos de órganos reproductores y cutícula de *A. suum*<sup>14,26</sup>, y las bandas de 18.5, 25.4 KDa coinciden con los antígenos de excreción-secreción determinados por Ramirez L<sup>12</sup>. La banda cuyo peso es de 34.6 KDa ha sido detectada como antígeno de excreción-secreción de larvas de estado tres y también en antígenos somáticos<sup>13</sup>. Los antígenos de peso de 41.9 y 45 KDa están dentro del rango de los antígenos cuticulares de *A. suum* los cuales están comprendidos entre 36 a 47 KDa<sup>42</sup>. Sin embargo, los antígenos de peso de 22 y 27KDa son proteínas que no son específicas de *A. suum*, porque otros autores las han determinado en infecciones producidas por *Anisakis simplex*, por lo tanto su detección tiene muy poco valor en el diagnóstico porque podría dar lugar a reacciones cruzadas<sup>25</sup>. Igualmente las proteínas de 61.1 y 65.0 KDa son responsables de reacción cruzada con *T. canis*, porque se encuentran dentro del rango 55-66 KDa, el cual ha sido determinado por el trabajo de Nunes y col<sup>45</sup>; otros autores también han mencionado que estos dos helmintos tienen varias bandas antigénicas comunes como Espinoza y col<sup>27</sup>.

La no presencia de bandas antigénicas al hacer la evaluación pre-inmune se debe a que los anticuerpos anti-antígenos no están presentes en ese fluido y por lo tanto cuando se enfrentan a los antígenos de líquido pseudocelómico no se produce reacción antígeno-anticuerpo<sup>47</sup>. Las bandas encontradas que solo aparecen en otros trabajos es debido a que los sueros con los que trabajan solo contienen algunas fracciones de antígenos de parásito y cada individuo tiene una respuesta inmune diferente, las condiciones del trabajo, al marcador de peso y a otros factores inherentes<sup>16</sup>.

## CONCLUSIÓN

El líquido pseudocelómico de *Ascaris suum*, sin tratar con Dithithreitol, presenta 15 bandas antigénicas, cuyos pesos en Kilodaltons (KDa) son: 101.0, 94.9, 65.0, 61.1, 50.6, 45.0, 41.9, 34.6, 27.0, 25.4, 21.0, 18.5, 16.3, 14.4 y 11.2 detectadas mediante la técnica de Western blot.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pullan RL, Brooker SJ. The global limits and populations at risk of soil-transmitted helminth infections in 2010. *Parasites & Vectors* 2012; 5: 81
2. Walker M, Hall A, Basáñez M-G. Individual predisposition, household clustering and risk factors for human infection with *Ascaris lumbricoides*: new epidemiological insights. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012; 5(4): e1047



3. Cooper PJ. Interactions between helminth parasites and allergy. *Curr Opin Allergy Immunol*, 2011; 9(1): 29-37
4. Scott ME. *Ascaris lumbricoides*: Una revisión de su epidemiología y su relación con otras infecciones. *Ann Nestle*, 2008; 66: 7-22.
5. Machiacado RJ, Marcos RL, Canales M, Terashima A, et al. Prevalencia de parasitosis intestinal en el Perú (2000-2010). *Re peru parasitol*, 2010; 18(Supl): s13
6. Sánchez J. Etiología y epidemiología de la ascariosis porcina. *Mundo ganadero*. 2002; 145: 42-48.
7. Boes J, Medley GF, Eriksen L, Roepstorff A, Nansen P. Distribution of *Ascaris suum* in experimentally and naturally infected pigs and comparison with *Ascaris lumbricoides* infections in humans. *Parasitology* 1998; 117: 589-596.
8. Roepstorff A. Natural *Ascaris suum* infections in swine diagnosed by coprological and serological (ELISA) methods. *Parasitol Res*. 1998; 84(7): 537-543.
9. Pérez ME, Gonzales AJ. Relación de Neumonía y Parasitosis de ciclo pulmonar en niños de 1 a 12 años en el Hospital Central "Antonio María Pineda" Barquisimeto-Venezuela. *Bol Med Postgrado*. 1994; 10(3): 192-195.
10. Alparo I, Tamayo L. Síndrome de Loeffler: Presentación de un caso. *Cuad Hosp Clin*. 2005; 50(2): 69-73.
11. Inatomi Y, Murakami T, Tokunaga M, Ishiwata K, Nawa Y, Uchino M. Encephalopathy caused by visceral larva migrans due to *Ascaris suum*. *J Neurol Sci*. 1999; 164(2): 195-199.
12. Ramírez L. Antígenos de excreción/secreción de *Ascaris lumbricoides* var *sum* detectados por Western Blot usando suero de *Oryctolagus cuniculus* "conejo" inmunizado experimentalmente. [Tesis Biólogo-Microbiólogo]. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú. 2002.
13. Escalante H, Liñán R, Díaz E, Davelois K, Huamantla O. Antígenos de larvas pulmonares de *Ascaris suum* reconocidos por anticuerpos producidos en *Oryctolagus cuniculus*. *Parasitol Latinoam*. 2005; 60(3-4): 132-137.
14. Leiva D, Colina JC, Escalante H, Jara CA. Antígenos de líquido pseudocelómico de *Ascaris suum* detectados por la técnica de Western Blot utilizando IgG producida en *Oryctolagus cuniculus* inmunizado experimentalmente. *REBIOL* 2012; 32(1): 49-57
15. Pauly D, Chacana PA, Calzado EG, Brembs B, Schade R. IgY Technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethyleneglicol (PEG) precipitation. *J Vis Exp*. 2011; (51): 235-254.
16. Cabrera JA, Castillo EE, Colina JC, Guzmán JA, Jara CA. Antígenos de fluido vesicular de *Cysticercus tenuicollis* detectados mediante la técnica de Western blot utilizando anticuerpos IgY e IgG. *REBIOL*. 2009; 29(1).
17. Bradford M. A rapid sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-254.
18. Escalante H, Davelois K, Torres P. Antígenos específicos de *Taenia solium* detectados por Western Blot usando suero de paciente con parasitosis confirmada. *SCIENDO*. 1999; 2 (1-2): 33-39.
19. Montes RC, Murcia C, Zarco L. Producción de anticuerpos antiprogesteroa a partir de la yema de huevo de gallinas y del suero sanguíneo de conejos, para ser utilizados en radioinmunoanálisis. *Vet Mex*. 1994; 25(2): 117-125.
20. Colina J, Leiva D, Escalante H, Jara CA. Antígenos del líquido pseudocelómico de *Toxocara canis* identificados mediante la técnica de Electroinmunotransferencia utilizando anticuerpos producidos en *Oryctolagus cuniculus*. *REBIOL*. 2011; 31(2).
21. Chávez F, Vásquez O, Escalante H. Evaluación de la técnica de Western Blot para la detección de antígenos de *Hymenolepis nana*. *Rev Peru Biol*. 2007; 14(2): 283-286.
22. De la Fuente A, Rodríguez J, Fonseca E. Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (Western Blot). *Piel*. 2007; 22(5): 252-258.
23. Escalante H, Davelois K, Ortiz P, Rodríguez H, Díaz E, Jara CA. Estandarización de la técnica de Western blot para el diagnóstico de la fasciolosis humana utilizando antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepática*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 2011; 28(3): 454-461
24. Frontera E, Serrano FJ, Carrón A, Mora JA, Pérez JE, Reina D. Caracterización antigénica de *Ascaris suum* mediante SDS-PAGE y Western blotting. *Invest Agr: Prod Sanid Anim*. 2001; 16(1): 153-163.
25. Ortega E, Cespon C, Bootello A, Moneo I, Gonzales P. Aislamiento y caracterización de antígenos principales de *Anisakis simplex*. *Alergol Inmunol Clin*. 2000; 15: 262-266.
26. Nunes CM, Tundisi RN, Garcia JF, Heinemann MB, Ogassawara S, Richtzenhain LJ. Cross-reactions between *Toxocara canis* and *Ascaris suum* in the diagnosis of visceral larva migrans by Western blotting technique. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1997; 39(5): 253-256.
27. 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. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2003; 64(1): 7-12.



# Efecto de *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre huevos de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio

## *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* effect on *Meloidogyne* sp. eggs under laboratory conditions

Gicelly A. T. Mendoza<sup>1</sup>, Juan H. Wilson<sup>2</sup>, Juan C. Colina<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Tesista de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú. <sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT. <sup>3</sup>Exalumno de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología. UNT.

### RESUMEN

Se determinó el efecto de *Trichoderma atroviride*, *T. harzianum* y *T. viride* sobre huevos de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio. Para ello, se trabajó con seis tratamientos (T), de los cuales tres fueron controles: T1, huevos de *Meloidogyne* sp. solos (control negativo); T2, huevos de *Meloidogyne* sp. con Oxamyl (control positivo) y T3, huevos de *Meloidogyne* sp. con *Pochonia chlamydosporia* (control positivo) y los otros tres experimentales: T4, huevos de *Meloidogyne* sp. con *T. atroviride*; T5, huevos de *Meloidogyne* sp. con *T. harzianum* y T6, huevos de *Meloidogyne* sp. con *T. viride*. A partir del cultivo puro de cada hongo, se preparó una suspensión de 10<sup>6</sup> conidias/mL de cada hongo y una suspensión de 900 ppm de oxamyl, se inoculó 2 mL de cada suspensión en pocillos que contenían 1 mL de agua destilada estéril con aprox. 100 huevos de *Meloidogyne* sp. incubándose por 72 horas, con cuatro repeticiones por tratamiento. Se concluye que *T. atroviride*, *T. harzianum* y *T. viride* tienen un efecto negativo sobre la evolución de los huevos de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio.

**Palabras clave:** *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Meloidogyne* sp., *Pochonia chlamydosporia*, Oxamyl.

### ABSTRACT

Effect of *Trichoderma atroviride*, *T. harzianum*, and *T. viride* on *Meloidogyne* sp.-ova under laboratory conditions was determined. To do this, we worked with six treatments (T), of which three were controls: T1, *Meloidogyne* sp. alone (negative control); T2, *Meloidogyne* sp. with Oxamyl (positive control) and T3, *Meloidogyne* sp. with *Pochonia chlamydosporia* (positive control) and three experimental: T4, *Meloidogyne* sp. with *T. atroviride*; T5, *Meloidogyne* sp. with *T. harzianum* and T6, *Meloidogyne* sp. with *T. viride*. From the culture of each fungus was prepared a suspension of 10<sup>6</sup> conidia/mL of each fungi suspension and 900 ppm of oxamyl, was inoculated into 2 mL of each suspension wells containing 1 mL of sterile distilled water at approx. 100 *Meloidogyne* sp. incubated for 72 hours, with four replicates per treatment. It was concluded that *T. atroviride*, *T. harzianum*, and *T. viride* have a negative effect on the development of eggs of *Meloidogyne* sp. under laboratory conditions.

**Keywords:** *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Meloidogyne* sp., *Pochonia chlamydosporia*, Oxamyl.



## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de las plantas ocasionadas por hongos, bacterias, virus y nematodos<sup>1</sup>, constituyen uno de los elementos limitantes para la producción de cualquier cultivo agrícola<sup>2</sup>. Entre los nematodos fitoparásitos que reducen significativamente la producción agrícola se encuentran los formadores de nódulos del género *Meloidogyne* sp.<sup>3</sup>, causando pérdidas del 14 % de la producción agrícola mundial, lo cual representa un tercio de las pérdidas atribuidas a plagas y enfermedades. Por tal motivo, se considera como el nematodo más común y destructivo de plantas<sup>4</sup>.

El género *Meloidogyne* sp. integra varias especies importantes para la agricultura. Algunas de sus especies son cosmopolitas y por sus hábitos polífagos son considerados como los más peligrosos para las plantas por tener un amplio rango de hospederos, parasitando prácticamente cualquier tipo de cultivo<sup>5,6</sup>. Entre las especies relacionadas con importantes pérdidas económicas se encuentran *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. hapla* y *M. arenaria*<sup>7,8,9</sup>.

Las especies del género *Meloidogyne* sp. poseen tres etapas en su ciclo de vida: huevo, tres estadios larvales y adulto<sup>10</sup>. Las hembras producen aproximadamente 3000 huevos contenidos en una matriz proteica gelatinosa, los que son depositados sobre la superficie de la raíz, y son inoculo efectivo para iniciar la infección de la planta. Los juveniles sufren una primera muda dentro del huevo, pasando de primer estadio larval (J1) a segundo estadio larval (J2), y cuando las condiciones de humedad y temperatura son favorables las larvas del segundo estadio eclosionan del huevo<sup>11</sup>. Las raíces de las plantas son parasitadas por el segundo estadio larval o juvenil infectivo de *Meloidogyne* sp.<sup>12</sup>, completando su ciclo vital en 1 – 2 meses, dependiendo de factores ambientales, por lo tanto pueden tener varias generaciones durante un cultivo<sup>13, 14</sup>.

Actualmente, el control químico es una de las medidas que más se utilizan para minimizar los daños causados por *Meloidogyne* sp.<sup>15</sup>. Sin embargo, una de sus principales limitaciones de uso es que contaminan el manto freático lo cual puede afectar a la salud humana, y si no se aplican de manera adecuada pueden ocasionar fitotoxicidad en las plantas y seleccionar poblaciones de nematodos resistentes<sup>5</sup>.

Por lo tanto, es necesario disponer de otras alternativas más compatibles con el ambiente, tales como el control biológico, donde a partir de bacterias del género *Bacillus*, *Pasteurela penetrans* (Thome) y hongos como *Paecilomyces lilacinus* y *Pochonia chlamydosporia*, se han obtenidos biopreparados de gran eficiencia en el control de fitonematodos<sup>15,16</sup>.

*P. chlamydosporia*, es un hongo parásito facultativo de huevos de nematodos, formando redes de hifas con órganos especializados que penetran la capa vitelina mediante lisis enzimática, el cual ha mostrado ser un agente potencial de control biológico de nematodos formadores de nódulos (*Meloidogyne* sp.)<sup>17,18</sup>.

Recientemente, se han reportado trabajos sobre el uso potencial de *Trichoderma* sp. en el control de *Meloidogyne* sp. Aunque, las especies del género *Trichoderma* sp. son más conocidas por estar entre los antagonistas más utilizados para el control de un grupo importante de patógenos del suelo, principalmente de los géneros *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotium* sp., *Pythium* sp. y *Fusarium* sp., entre otros<sup>19</sup>.

Existe poca información sobre los mecanismos utilizados por las especies de *Trichoderma* sp. en el control de nematodos. Sin embargo, se hablan de dos mecanismos, el primero es el parasitismo directo de huevos o larvas mediante el aumento de la actividad de quitinasas o proteasas, siendo este un indicativo de infectar huevos de nematodos; y el segundo es la inducción de los mecanismos de defensa de la planta<sup>20</sup>.

Ferreira *et. al.*<sup>21</sup>, reportó que de todos los aislamientos que realizó, el aislamiento T-1 de *Trichoderma* sp. fue el más eficaz en el control de *M. exigua*, logrando parasitar al 53,33% de los huevos de este nematodo. Así mismo, Madail R.<sup>22</sup> reportó que todos los tratamientos “*in vitro*” que realizó con aislamientos de *Trichoderma* sp. parasitaron a los huevos de *M. javanica* envolviéndolos con sus hifas.

Teniendo en cuenta que las especies de *Trichoderma* sp. son muy usadas en el control biológico de hongos fitopatógenos; y que además se ha demostrado que *Trichoderma* sp. también puede controlar nematodos, permitiendo que los agricultores empleen *Trichoderma* sp. no solo como hongo antagonista, sino también como hongo nematófago; haciendo que los costos del tratamiento de sus cosechas



disminuyan ya que necesitarían aplicar un solo tipo de controlador biológico. Por tal motivo, se hace necesaria la búsqueda de hongos que tengan la capacidad de controlar nematodos, por lo cual la presente investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre huevos de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Obtención de cultivo joven de *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. viride* y *P. chlamydosporia*.

A partir de cada cultivo puro de *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. viride*, y *P. chlamydosporia* se procedió a resembrar por puntura respectivamente, en tubos de ensayo conteniendo Agar Papa Dextrosa (APD), los cuales fueron incubados a 25°C durante 7 días, obteniéndose así un cultivo joven de *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. viride* y *P. chlamydosporia*.

### Obtención de huevos de *Meloidogyne* sp.

Las masas de huevos fueron extraídas de raíces de *P. volubilis* “Sacha Inchi” que se encontraban infectadas con *Meloidogyne* sp. Las raíces fueron lavadas con agua de caño y los nódulos presentes fueron cortados y llevados al esteroscopio para la extracción de masas de huevos. Las masas de huevos fueron colocadas en frascos de penicilina que contenían una solución de hipoclorito de sodio al 3 % para su lavado, sometiéndolos a agitación por 5 minutos aproximadamente. Luego se enjuagaron 5 veces consecutivas con agua destilada estéril para eliminar trazas residuales de hipoclorito de sodio<sup>10,22</sup>. En seguida se procedió al conteo del número de huevos de *Meloidogyne* sp.

### Estandarización de *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. viride* y *P. chlamydosporia*.

A partir del cultivo puro de cada hongo, mediante la cámara de Neubauer se preparó una suspensión de 10<sup>6</sup> conidios/mL.

### Preparación de Oxamyl.

Se agregó 2 mL del Nematicida a un matraz conteniendo 98 mL de agua destilada, cantidad necesaria para lograr una concentración de 900 ppm.

### Inoculación de huevos de *Meloidogyne* sp.

Se colocó 2mL de suspensión de cada tratamiento experimentales en pocillos, por separado, luego se inoculó 1mL de agua destilada estéril con aproximadamente 100 huevos de *Meloidogyne* sp. a cada tratamiento. Para los tratamientos control se siguió con el mismo procedimiento.

### Lectura

La evaluación se realizó a las 24, 48 y 72 horas después de la inoculación, realizándose observaciones al microscopio a 40X respectivamente. Cada tratamiento constó de 4 repeticiones.

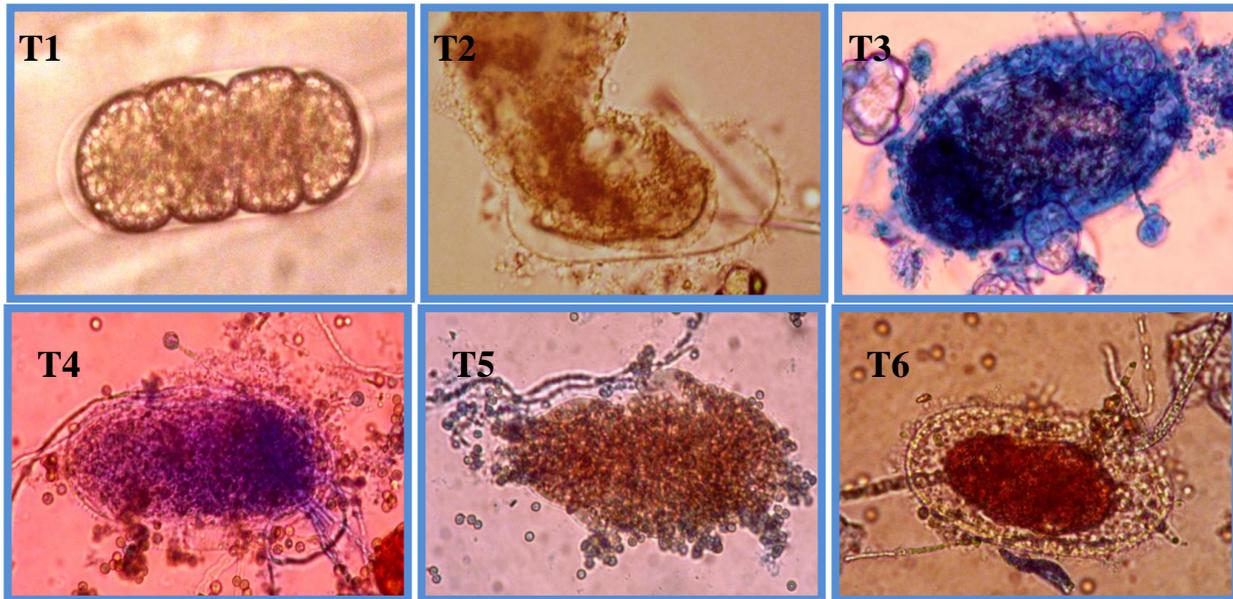
## RESULTADOS

Se observó que tanto *T. atroviride*, *T. harzianum* y *T. viride* como los tratamientos positivos destruyen los huevos de *Meloidogyne* sp., en una secuencia de parasitismo que concluye con la completa destrucción a las 72 horas (Figs. 1, 2, 3 y 4)

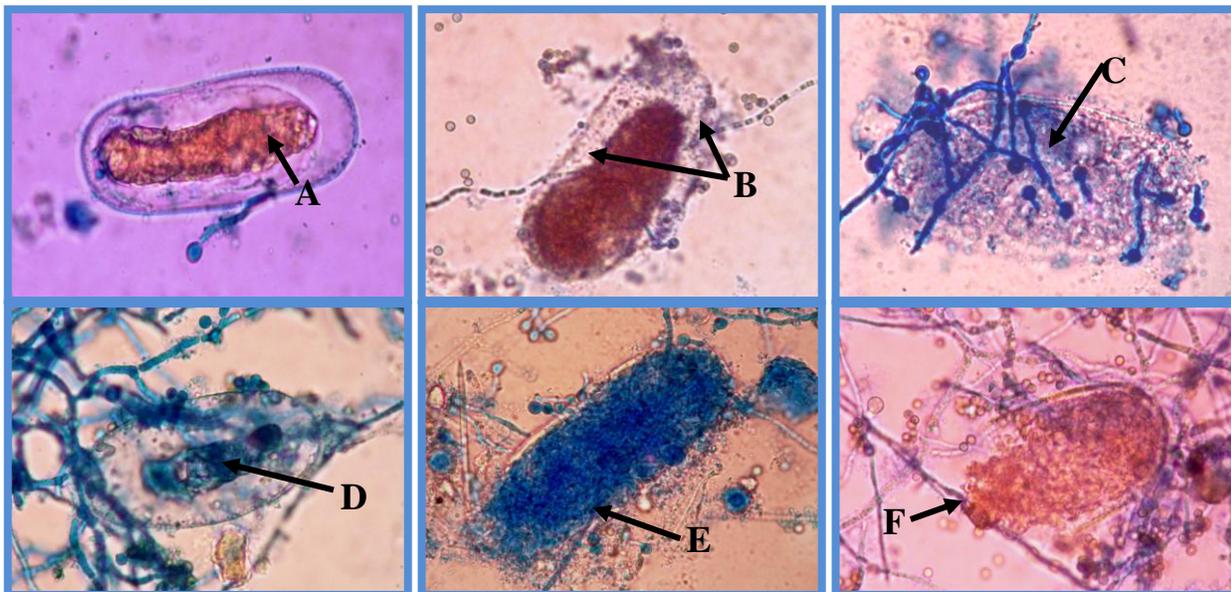
## DISCUSIÓN

Al evaluar el efecto de *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre huevos *Meloidogyne* sp. se observó que la destrucción que sufren los huevos de *Meloidogyne* sp. por *T. atroviride*, *T. harzianum* y *T. viride* (Fig. 1, 2, 3 y 4), esto quizás se deba a que este género parasita al fitopatógeno mediante enrollamiento, ganchos y cuerpo de tipo apresorio, que penetran la pared celular por acción hidrolítica de las enzimas quitinasas y gluconasas<sup>23</sup>. Estas enzimas pueden degradar la cutícula de los insectos, cuya estructura está compuesta por quitina<sup>24,25,26</sup>. La quitina está presente en la cutícula de los huevos de nematodos, afectándose grandemente con el tratamiento de las especies de *Trichoderma*<sup>27,28</sup>. Además, *Trichoderma* es capaz de producir diferentes antibióticos volátiles y no volátiles; y que se ha demostrado que puede parasitar, controlar y destruir los fitonematodos<sup>15</sup>. Es así que, Pérez *et. al.*<sup>29</sup> afirman

que *Trichoderma* spp. es un biorregulador efectivo contra nematodos del género *Meloidogyne* por medio de sus toxinas e hifas. Sharon *et. al.*<sup>30</sup>, observó que las enzimas extracelulares tales como quitinasas



**Fig. 1.** Observación microscópica (40x) de huevos de *Meloidogyne* sp. sometidos a diferentes tratamientos, luego de 72 horas de inoculación: **T1.** Huevo de *Meloidogyne* solo, **T2.** Huevo de *Meloidogyne* con oxamyl, **T3.** Huevo de *Meloidogyne* sp. con *Pochonia chlamydosporia*, **T4.** Huevo de *Meloidogyne* sp. con *Trichoderma atroviride*, **T5.** Huevo de *Meloidogyne* sp. con *Trichoderma harzianum*, **T6.** Huevos de *Meloidogyne* sp. con *Trichoderma viride*



**Fig. 2.** Observación microscópica (40 x) de la secuencia de destrucción que sufren los huevos de *Meloidogyne* sp. frente a *Trichoderma atroviride*, a las 24, 48 y 72 horas de incubación: **A.** Adherencia de hifa, **B.** Penetración de hifa, **C.** Colonización de hifas, **D.** Deformación de embrión, **E.** Desintegración de pared y **F.** Ruptura de huevo.

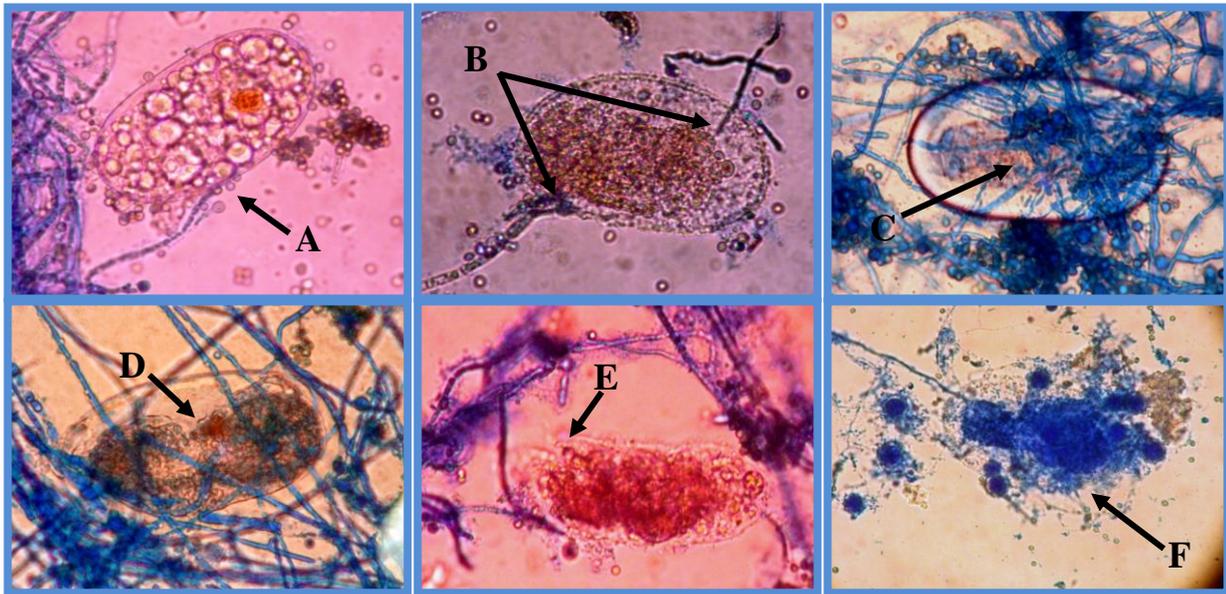


Fig. 3. Observación microscópica (40 x) de la secuencia de destrucción que sufren los huevos de *Meloidogyne* sp. frente a *Trichoderma harzianum*, a las 24, 48 y 72 horas de incubación: A. Adherencia de hifa, B. Penetración de hifa, C. Colonización de hifas, D. Deformación de embrión, E. Desintegración de pared y F. Ruptura de huevo.

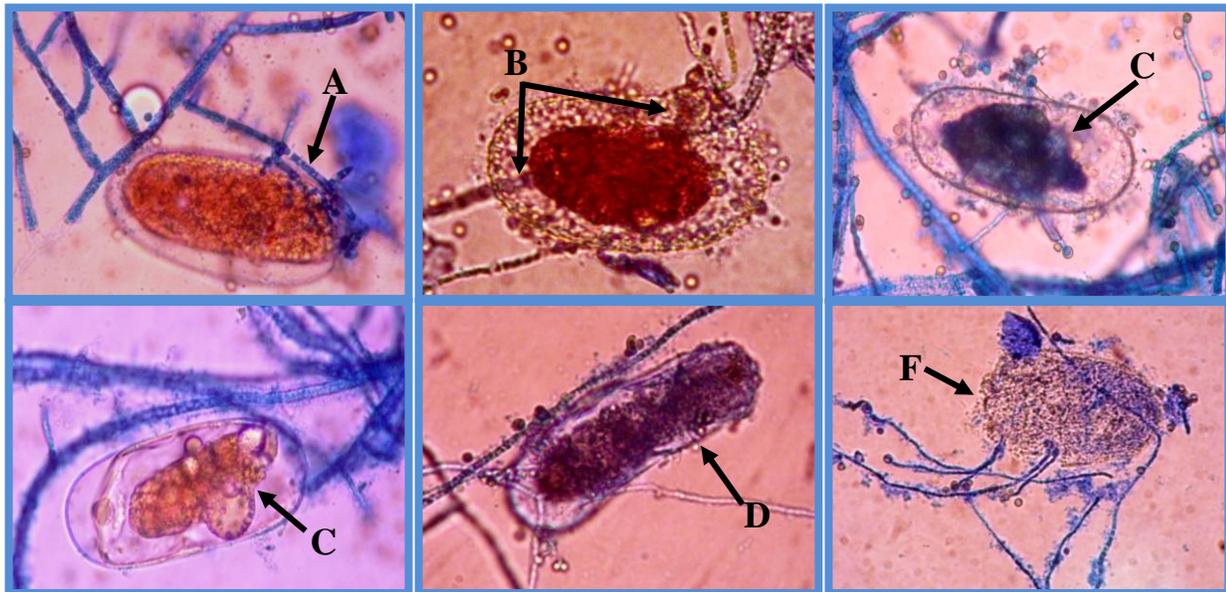


Fig. 4. Observación microscópica (40 x) de la secuencia de destrucción que sufren los huevos de *Meloidogyne* sp. frente a *T. viride*, a las 24, 48 y 72 horas de incubación: A. Adherencia de hifa, B. Penetración de hifa, C. Colonización de hifas, D. Deformación de embrión, E. Desintegración de pared y F. Ruptura de huevo.

y proteasas con actividad antifúngica participan en la relación de interacción de *M. javanica* y *Trichoderma* sp.



Asimismo, si bien la mayoría de los nematocidas como el oxamyl controlan muy bien los nematodos como se puede ver en la Fig 1, este tiene cierto efecto negativo sobre la planta, ya que paralizan su desarrollo radicular, unido a la destrucción de mucha flora microbiana natural<sup>31</sup>.

## CONCLUSIÓN

- *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* tienen un efecto negativo sobre los huevos de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Godoy T, Yañez M. El nematodo agallador. En: Memorias del curso de fitopatógenos del suelo en hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa, México; 1999; p. 19 – 22.
2. Sandoval B, Claudio R. Manejo integrado de enfermedades en cultivos hidropónicos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Universidad de Talca. 2004; p. 1 – 53.
3. Carrillo – Fasio J, García - Estrada R, Allende – Molar R, Márquez – Zequera I, Cruz – Ortega J. Identificación y Distribución de Especies del Nematodos Nodulador (*Meloidogyne* spp.) en Hortalizas, en Sinaloa, México. Rev. Mexicana de Fitopatología. 2000; 18(2): 115 – 119.
4. Guzmán O, Castaño J. Identificación de Nematodos Fitoparásitos en Guayabo (*Psidium guajava* L.), en el Municipio de Manizales (Caldas), Colombia. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 2010; 34 (130): 117 – 125.
5. Cristóbal J, Herrera – Parra E, Reyes V, Ruiz E, Tun J, Celis T. *Glomus intraradices* para el control de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood en condiciones protegidas. Rev. Fitosanidad. 2010; 14: 25 – 29.
6. Leyva A, Castellanos L, Pérez A. Alternativas de lucha contra nematodos noduladores en el cultivo del pepino en condiciones de organopónicos. Rev. Centro Agrícola. 2009; 36(2): 5 – 10.
7. Castagnone - Sereno P. Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes? Euphytica. 2002; 124: 193 – 199.
8. Ornat C, Verdejo – Lucas S. Distribución y Densidad de Población de *Meloidogyne* spp. en Cultivos Hortícolas de la Comarca de El Maresme (Barcelona). Rev. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. 1999; 14 (2): 191 – 201.
9. Jacquet M, Bongiovanni M, Martínez M, Verschave P, Wajnberg E, Castagnone-Sereno P. Variation in resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato genotypes bearing the *Migene*. Rev. Plant Pathol. 2005; 54: 93 – 99.
10. Cedeño D. Control de *Meloidogyne* spp. en pepino (*Cucumis sativa*) con Micorriza Vesículo Arbuscular (VAM) (Mycoral®), *Trichoderma harzianum* y *Paecilomyces lilacinus*. [Tesis para optar el Grado Académico de Licenciado]. Honduras: Zamorano; 2005.
11. Vanholme B, De Meutter J, Tytgat T, Van Montagu M, Gheysen G. Secretions of plant – parasitic nematodes: A molecular update. Rev. Gene. 2004; 332: 13 – 27.
12. Arias Y, González I, Rodríguez M, Rosales C, Suárez Z, Peteira B. Aspectos generales de la interacción tomate (*Solanum lycopersicon* L.) – *Meloidogyne incognita*. Rev. Protección Veg. 2009; 24: 1 – 13.
13. Karssen G, Moens M. Root – knot nematodes. En Plant Nematology (Perry R, Moens M *et. al.*). Rev. Plant Nematology. Wallingford, U.K. 2006.
14. Costam M *et. al.* Patogenicidade e reproducao de *Meloidogyne incognita* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com aplicacao de filtrados fungicos ou extratos de plantas e de esterco animais. Rev. Nematologia Brasileira, Brasilia. 2000; 24: 219 – 226.
15. Baños Y *et. al.* Efecto de enmiendas orgánicas y *Trichoderma* spp. en el manejo de *Meloidogyne* spp. Rev. Bras. de Agroecología. 2010; 5(2): 224 – 233.
16. Madail R. Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris*. [Tese Doutoral]. Porto Alegre (RS), Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do sul Faculdade de Agronomía; 2008.
17. Hidalgo L, Bourne J, Kerry B, Rodríguez M. Nematophagous *Verticillium* spp. in soil infested with *Meloidogyne* spp. on coffee in Cuba. Isolation and characterization. Rev. International Journal Pest Management. 2000; 46: 277 - 284.
18. Atkins S, Hidalgo L, Kalisk H, Mauchline T; Hirsch P, Kerry B. Development of a new management strategy for the control of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production. Rev. Pest Management Science. 2003; 59: 183 – 189.



19. Ezziyyani M, Pérez C, Sid A, Requena M, Candela M. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). Rev Anales de Biología. 2004; 26: 35 – 45.
20. Sharon E *et. al.* Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Rev. Biological Control. 2001; 91 (7): 687- 693.
21. Ferreira P, Ferraz S, Lopes E, Grassi L. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. Rev. Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas. 2008; 2 (3): 15.
22. Zavaleta E. Alternativas del manejo de las enfermedades de las plantas. Rev. Terra. 1999; 17 (3): 201 – 207.
23. Zeilinger S, Omann M. *Trichoderma* biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. Rev. Gene Regul Syst Bio. 2007; 1: 227 – 234.
24. Sharma P, Pandey R. Biological control of root-knot nematode; *Meloidogyne incognita* in the medicinal plant; *Withania somnifera* and the effect of biocontrol agents on plant growth. Rev. Afr J Agric Res. 2009; 4(6): 564 – 567.
25. Bokhari F. Efficacy of some *Trichoderma* species in the control of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. Rev. Arch Phytopathol Plant Prot. 2009; 42(4): 361 – 369.
26. Shakeri J, Foster HA. Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects. Rev. Enzyme Microb. Technol. 2007; 40(4): 961 – 968.
27. Haggag W, Amin A. Efficiency of *Trichoderma* species in control of *Fusarium* root knot and reniform nematodes disease complex on sunflower. Rev. Pakistan J Biol Sci. 2001; 4(3): 314 – 318.
28. Jin R, Suh J, Park R, Kim Y, Krishnan H, Kim K. Effect of chitin compost and broth on biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Rev. Nematology. 2005; 7: 125 – 132.
29. Pérez J *et. al.* *Trichoderma*: alternativa para el control biológico de nematodos en el marco de una agricultura sostenible. Rev. Fitosanidad. 2006; 10 (2): 165.
30. Sharon E. Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. Rev. Europa Journal Plant Pathology, London. 2007; 118: 247 – 258.
31. Calvo B, López R. Combate de *Meloidogyne incognita* en dos cultivos de tabaco Burley. Rev. Agronom. Costarr. 1980; 4 (2): 175 – 180.



# Prevalencia del parasitismo por *Eimeria* en bovinos, *Bos taurus*, del Distrito Pacanga (La Libertad, Perú) y su relación con factores sociodemográficos y ambientales

Prevalence of parasitism by *Eimeria* in cattle, *Bos taurus*, from Pacanga (La Libertad, Peru) District and its relationship to sociodemographic and environmental factors

Juan C. Colina<sup>1</sup>, Gicelly A. Mendoza<sup>1</sup>, Cesar A. Jara<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tesista de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional de Trujillo (UNT). <sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, UNT, Trujillo-Perú

## RESUMEN

Las especies de *Eimeria* son parásitos intracelulares obligados pertenecientes al grupo de los apicomplexos, que representa el grupo más patógeno dentro de los coccidios intestinales en vacunos a los que produce diarrea disentérica y elevadas pérdidas económicas. En la presente investigación se determinó la prevalencia del parasitismo por *Eimeria* en bovinos, *Bos Taurus*, del Distrito Pacanga (La libertad, Perú) y su relación con factores sociodemográficos y ambientales. La prevalencia global del parasitismo gastrointestinal por *Eimeria* en vacunos de ambas localidades fue de 84.9% y presentó diferencia significativa con los factores edad, raza y traslado de ganado. Se identificaron 10 especies de las cuales *Eimeria bovis*, *E. zuerni* y *E. auburnensis* fueron las más prevalentes. Se encontró diferencia significativa de algunas especies cuando se relacionó las prevalencias de parasitismo con los factores Sociodemograficos: edad, raza y sexo, y los Ambientales: localidad y traslado de ganado.

**Palabras clave:** *Eimeria bovis*, *E. zuerni*, *E. auburnensis*, *Bos Taurus*, apicomplexa

## ABSTRACT

*Eimeria* species are obligate intracellular parasites belonging to the group of apicomplexa, which represents the most pathogenic groups within intestinal coccidia in cattle to diarrhea and dysentery produces high economical losses. In the present study the prevalence of parasitism by *Eimeria* in cattle, *Bos taurus*, from Pacanga District (La Libertad, Peru) and its relationship to sociodemographic and environmental factors was determined. The overall prevalence of gastrointestinal parasitism by *Eimeria* in cattle at both settlement examined was 84.9 % and showed significant difference with the factors age, race and cattle drive. 10 species of *Eimeria* were identified which, *E. bovis*, *E. zuerni* and *E. auburnensis* were the most prevalent. Significant difference was found in some species when the prevalence of parasitism was associated sociodemographic factors: age, race and sex, and the Environment: location and movement of livestock.

**Keywords:** *Eimeria bovis*, *E. zuerni*, *E. auburnensis*, *Bos Taurus*, apicomplexa



## INTRODUCCIÓN

Las infecciones por parásitos gastrointestinales en rumiantes es producido por diferentes especies de protozoarios<sup>1,2</sup>, y helmintos<sup>3,4</sup>; y las frecuencias e intensidades de parasitación varían en las diferentes zonas geográficas del mundo debido a que se hayan influenciadas por una serie de factores dependientes del parásito<sup>5</sup>, del huésped<sup>1,2</sup> y del ambiente<sup>3</sup>. La infección por protozoos está representada principalmente por miembros del género *Eimeria*, habiéndose identificado hasta 10 especies diferentes, siendo las más prevalentes *E. bovis*, *E. auburnensis* y *E. ellipsoidalis*<sup>6</sup>, sobre todo en el ganado de edad menor a los 2 años<sup>1,7</sup>, grupo en el cual se han hallado frecuencias del 45%<sup>7,8,9</sup>.

Pacanga y Pacanguilla son localidades del distrito de Pacanga, ubicados a 90 msnm, de clima cálido, seco, con escasas lluvias, inferiores a 10-30 mm/año y una humedad relativa de 74.8 %. La población, es principalmente agricultora y ganadera. El distrito Pacanga consta aproximadamente de 3700 cabezas de ganado, de las cuales 1370 son vacas de ordeña. Al desconocerse la presencia de estos parásitos en dichas zonas se realizó el presente trabajo con la finalidad de determinar la prevalencia del parasitismo gastrointestinal por *Eimeria* en bovinos, *Bos Taurus*, del Distrito Pacanga (La libertad, Perú) y su relación con factores sociodemográficos y ambientales.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales y determinación del parasitismo por *Eimeria*:

La investigación se realizó entre enero y marzo del 2013 y se examinaron 338 muestras fecales correspondientes al mismo número de animales, mediante las técnicas de flotación-centrifugación con solución saturada de azúcar para detectar ooquistes<sup>10,11</sup>, previa esporulación. La esporulación de ooquistes de coccidios se indujo usando solución de dicromato de potasio al 2 %<sup>10,11</sup>. Los coccidios se identificaron por su tamaño, ausencia, presencia y forma del micrópilo y número de esporoquistes y esporozoítos.

### Relación con los factores sociodemográficos y ambientales:

Los resultados de prevalencias se expresaron en porcentajes y la relación con los factores sociodemográficos y ambientales se hizo mediante la prueba Chi cuadrado usando el programa SPSS v.19. Para esto, los animales se agruparon según el factor a evaluar: (i) **edad**: 0 a 12 meses, Mayores de 12 a 36 meses y Mayores de 36 meses, (ii) **raza**: Cebú, Holstein y Brown swiss, (iii) **sexo**: Hembra y Macho, (iv) **localidad**: Pacanguilla y Pacanga y (v) **traslado de ganado**: Animales trasladados y Animales no trasladados.

## RESULTADOS

La prevalencia global del parasitismo gastrointestinal por *Eimeria* en vacunos de ambas localidades fue de 84.9% y presentó diferencia significativa con los factores edad, raza y traslado de ganado (Tabla 1). Se identificaron 10 especies de las cuales *Eimeria bovis*, *E. zuerni* y *E. auburnensis* fueron las más prevalentes (Fig. 1). Se encontró diferencia significativa de algunas especies cuando se relacionó las prevalencias de parasitismo con los factores Sociodemograficos: Edad (Fig. 2), Raza (Fig. 3) y Sexo (Fig. 4), y los Ambientales: Localidad (Fig. 5) y Traslado de ganado (Fig. 6).

## DISCUSIÓN

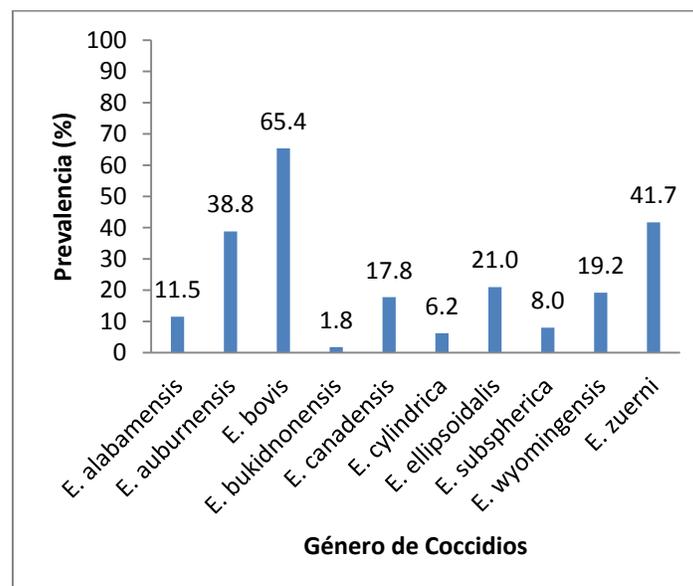
La identificación de coccidios se realizó por la forma y tamaño del Ooquiste, ausencia, presencia y forma del micrópilo; y cantidad de Ooquistes y esporozoítos<sup>10,12</sup>. En el presente trabajo se encontró un alto porcentaje de infección por coccidios al igual que en otros trabajos donde se reporta desde 26.7%<sup>13</sup>,



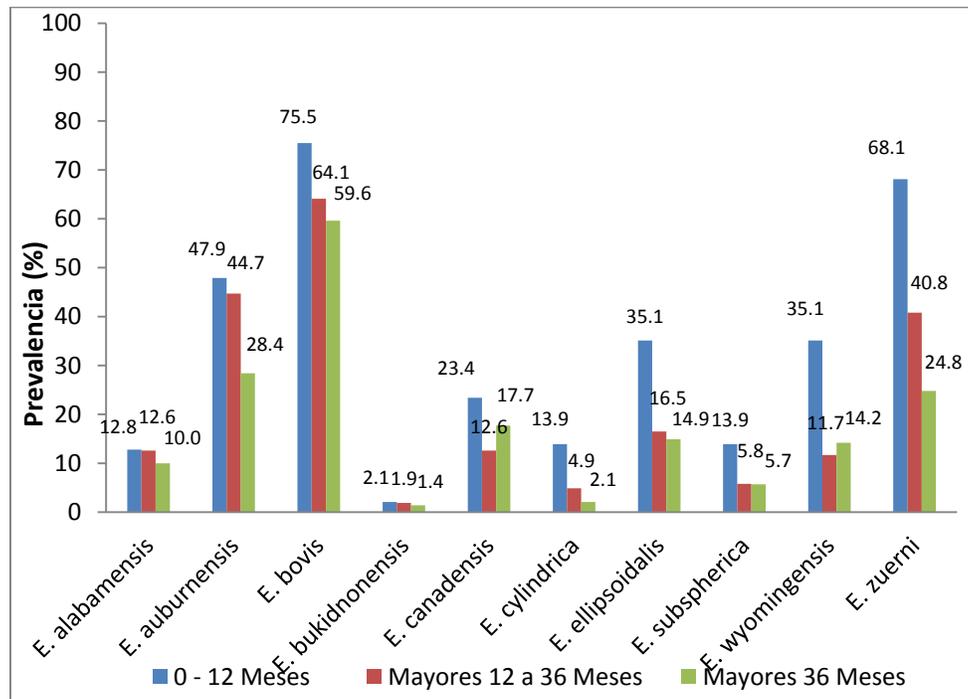
83.7%<sup>9</sup> hasta 100%<sup>14</sup>. Los coccidios presentan una mayor prevalencia en animales menores de 3 años así como también lo reporta Díaz *et. al.*<sup>15</sup> que halló una prevalencia de 63 y 65% en animales menores de 12 y animales entre 12 y 24 meses respectivamente, y una menor prevalencia en animales mayores de 24 meses, esto se debe tal vez a una cuestión de inmunidad la cual se desarrolla al alcanzar el año de edad<sup>1,3</sup>. Se encontró un elevado porcentaje de los coccidios *E. bovis*, *E. auburnensis* y *E. zuerni*; en otros trabajos Koutny *et. al.*<sup>9</sup>, encontró nueve de la especies de *Eimeria* identificadas en este trabajo excepto *E. subspherica*, siendo las de mayor prevalencia *E. bovis*, *E. ellipsoidalis* y *E. zuerni*.

**Tabla 1.** Prevalencia del parasitismo por *Eimeria* spp. en bovinos, *Bos taurus*, del Distrito Pacanga (La Libertad, Perú), en relación con factores sociodemográficos y ambientales.

Factor		PARASITISMO (%)	Prueba
<b>Edad</b>	0-12 meses	90.4	
	Mayores 12- 36 meses	87.4	p < 0.05
	Mayores 36 meses	97.4	
<b>Sexo</b>	Hembra	84.3	p > 0.05
	Macho	87.1	
<b>Raza</b>	Cebú	86.8	
	Holstein	81.7	p < 0.05
	Brown Swiss	86.7	
<b>Localidad</b>	Pacanga	86.6	p > 0.05
	Pacanguilla	82.4	
<b>Traslado de ganado</b>	Traslada	88.5	p < 0.05
	No Traslada	79.1	

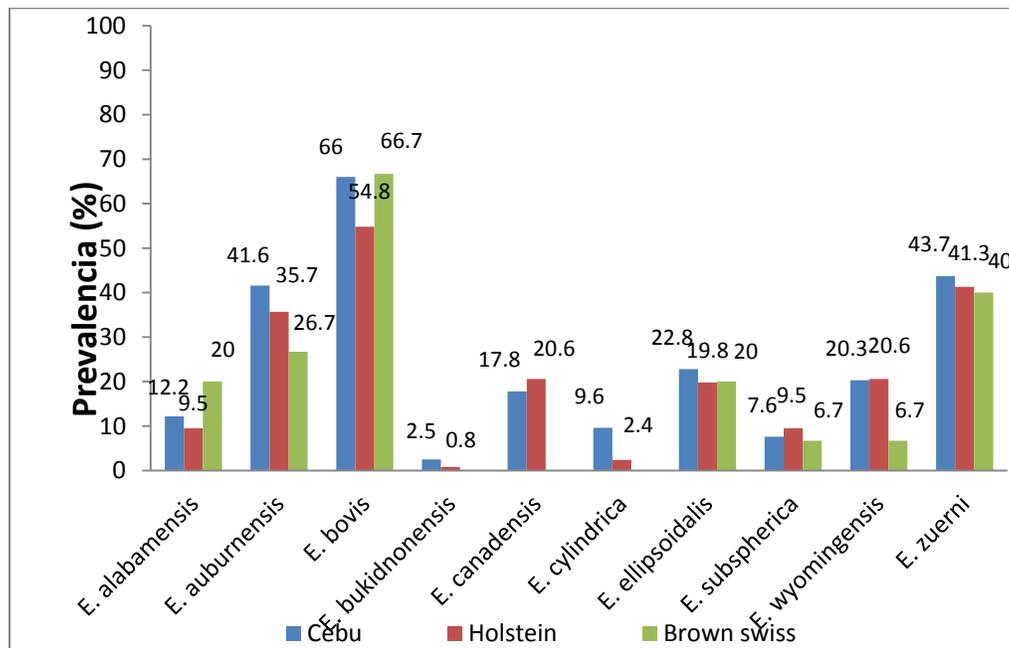


**Fig. 1.** Prevalencia del parasitismo por especies de *Eimeria* en bovinos, *Bos taurus*, del Distrito Pacanga (La Libertad, Perú), entre Enero y Marzo del 2012.



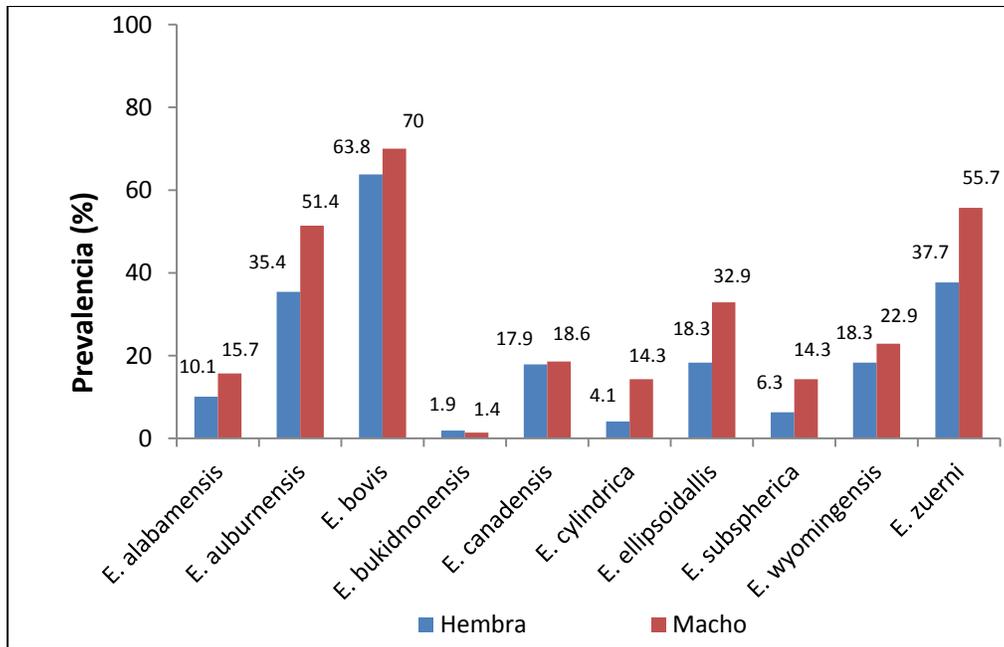
*E. auburnensis, E. cylindrica, E. ellipsoidalis, E. subspherica, E. wyomingensis, E. zuerni*:  $p < 0.05$

Fig. 2. Prevalencia del parasitismo gastrointestinal por Coccidios en bovinos, *Bos taurus*, del Distrito Pacanga (La Libertad, Perú), entre Enero y Marzo del 2012 relacionado a la edad.



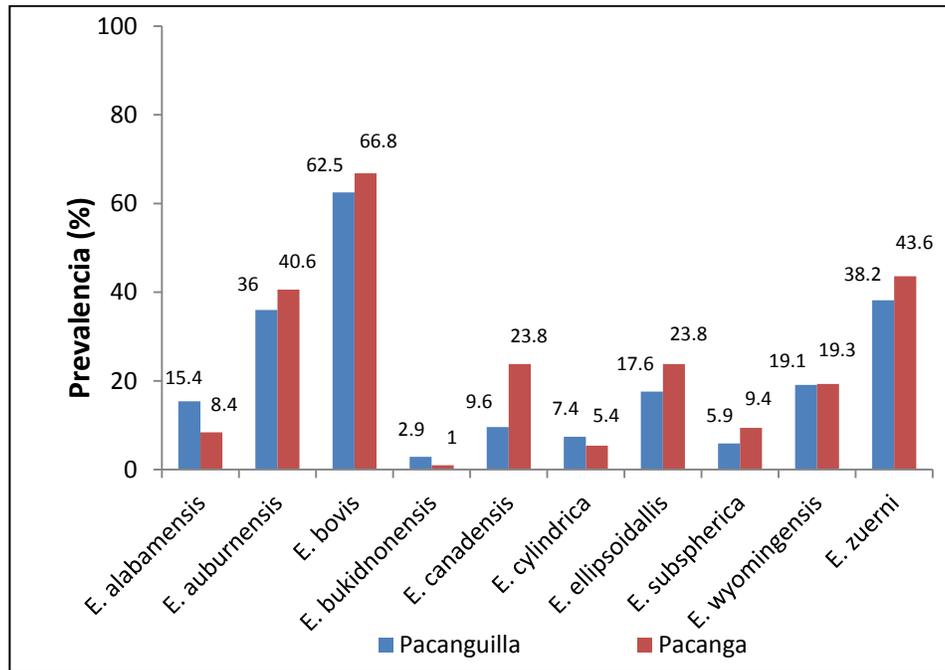
*E. cylind.*:  $p < 0.05$

Fig. 3. Prevalencia del parasitismo gastrointestinal por Coccidios en bovinos, *Bos taurus*, del Distrito Pacanga (La Libertad, Perú), entre Enero y Marzo del 2012 relacionado a la raza.



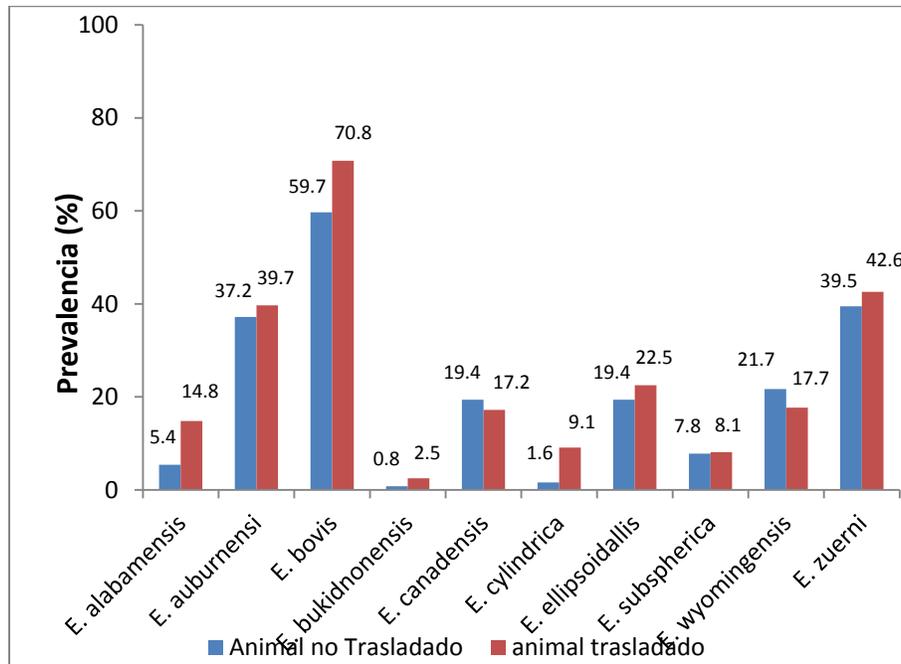
*E. aubur.*, *E. cylind.*, *E. ellipsoid.*, *E. subspher.*, *E. zuerni*:  $p < 0.05$

Fig. 4. Prevalencia del parasitismo gastrointestinal por Coccidios en bovinos, *Bos taurus*, del Distrito Pacanga (La Libertad, Perú), entre Enero y Marzo del 2012 relacionado al sexo.



*E. alabam.*, *E. canad.*:  $p < 0.05$

Fig. 5. Prevalencia del parasitismo gastrointestinal por Coccidios en bovinos, *Bos taurus*, del Distrito Pacanga (La Libertad, Perú), entre Enero y Marzo del 2012 relacionado a la localidad.



*E. alabamensis*, *E. cylindrica*:  $p < 0.05$

Fig. 6. Prevalencia del parasitismo gastrointestinal por Coccidios en bovinos, *Bos taurus*, del Distrito Pacanga (La Libertad, Perú), entre Enero y Marzo del 2012 relacionado al traslado o no de ganado a otras localidades.

Al considerar la edad de los animales hubo mayor prevalencia de coccidios en animales menores de 12 meses, los que tuvieron diferencia significativa fueron, *E. auburnensis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis*, *E. subspherica*, *E. wyomingensis* y *E. zuerni*, estos resultados concuerdan con los trabajos de Barragán<sup>16</sup> y Angulo *et al*<sup>7</sup> que encontraron que en animales menores de 6 meses resaltan la frecuencia de coccidios. Para la variable raza sólo *E. cylindrica* tiene diferencia significativa, se observa a la raza Cebú con una ligera mayor prevalencia del coccidio mencionado, esto se debe a que la raza cebú es resistente a la infección por varios parásitos pero conforme se va cruzando la raza va perdiendo dicha resistencia<sup>18</sup>.

La prevalencia según el sexo del animal tuvieron diferencias significativas las infecciones por *E. auburnensis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis*, *E. subspherica* y *E. zuerni*, en animales machos, esto se puede deber a que los animales machos en su mayoría son menores de 12 meses por lo tanto son más susceptibles a las infecciones por coccidios mientras que en los machos mayores a un año se puede deber a sus hormonas sexuales, las cuales suprimen la respuesta humoral y celular<sup>19</sup>.

La distribución de los coccidios por localidad es variada, teniendo una diferencia significativa *E. canadensis*, la cual presenta una mayor prevalencia en la localidad de Pacanga mientras que *E. alabamensis* lo hacen en Pacanguilla. Esto se debe quizá a que son parásitos de ciclos directos y cosmopolitas, por lo tanto pueden estar distribuidos en cualquier lugar variando de un lugar a otro por factores climáticos y geográficos<sup>3</sup>.

## CONCLUSIÓN

- Hay una alta prevalencia de coccidios, siendo los prevalentes *E. bovis*, *E. zuerni*, *E. auburnensis*.
- Hay diferencia significativa entre los factores edad, raza y sexo del ganado así como localidad y traslado de ganado a otras localidades y la prevalencia de parasitismo gastrointestinal por algunas especies de *Eimeria*.
- La intensidad de parasitismo por el género *Eimeria* es baja, teniendo relación solo con el factor edad del ganado.



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Dauschies A, Najdrowski M. Eimeriosis in cattle: current understanding. *J Vet Med* 2005; B 52: 417-427
2. Saratsis A, Joachim A, Alexandros S, Sotiraki S. Lamb coccidiosis dynamics in different dairy production systems. *Vet Parasitol* 2011; 181: 131-138
3. Lasson B, Vltrop A, Kaahein K, Jarvis T. *Eimeria* and *Cryptosporidium* in Estonian dairy farms in regard to age, species, and diarrhoea. *Vet Parasitol* 2009; 160: 212-219
4. Blood D, Radostits O. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9<sup>na</sup> ed. España: MacGraw-Hill- Interamericana. 2002.
5. Rodríguez – Diego J, Olivares J, Arece J, Roque E. Evolución de los parásitos: consideraciones generales. *Salud Anim.* 2009; 31: 13 – 17.
6. Hidalgo J. Estudio de la fauna helmintológica de abomaso e intestino delgado en bovinos (*Bos taurus*) beneficiados en matadero de Nueva Imperial, IX Región. Chile. [Tesis para Título] Universidad Católica de Temuco. Escuela de Medicina Veterinaria. Temuco. Chile; 2004.
7. Pinedo R, Chávez A, Casas E, Suárez F, Sánchez N, Huamán H. Prevalencia de tremátodos de la Familia Paramphistomatidae en bovinos del Distrito de Yurimaguas, Provincia de Alto Amazonas, Loreto. *Inv. Vet.* (Perú). 2010; 21 (2): 161-167.
8. Regassa F, Sori T, Dhuguma R, Kiros Y. Epidemiology of Gastrointestinal Parasites of Ruminants in Western Oromia, Ethiopia. *Intern J Appl Res Vet Med.* 2006; 4.
9. Farkas R; Szeidemann Z, Majoros G. Studies on Coccidiosis of Calves in Hungarian Dairy Farms. *Parasitol Res.* 2007; 101: S113 – S120.
10. De Waal T. Advances in diagnosis of protozoan diseases. *Vet Parasitol* 2012; 189: 65-74
11. Rodríguez R, Cob L. Técnicas Diagnósticas En Parasitología Veterinaria. 2<sup>da</sup> ed. México: Universidad Autónoma de Yucatán; 1997.
12. Banner B, Philip H. *Veterinary Protozoology.* 2<sup>da</sup> ed. Edit. Publishing Company Mineapolis, U.S.A. 1949.
13. Dreyer K Fourie L, Kok D. Gastro-intestinal parasites of cattle in the communal grazing system of botshabelo in the free state. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research.* 1999; 66: 145 – 149.
14. Choperena M, Cardona E, Quijano C, López G. Caracterización de nematodos gastrointestinales de vacunos que llegan a la central ganadera de Medellín. *Col Cienc Pec.* 2005; 18 (4): 384 -385.
15. Díaz A, Justo J, González M, Piña E. Prevalencia de coccidiosis en bovinos de los llanos de Monay, Estado Trujillo, Venezuela. *FCV-LUZ.* 1998; 8(4): 346-353.
16. Barragán S, Pertuz G. Prevalencia de parásitos gastrointestinales y pulmonares en terneros lactantes pertenecientes a explotaciones ganaderas del noroccidente del Municipio de Majagual, Sucre. [Tesis para Título]. Universidad de Sucre, Facultad de ciencias Agropecuarias, Sucre; 2006.
17. Rodríguez R, Cob-Galera L, Domínguez-Alpizar J. Frecuencia de parásitos gastrointestinales en animales domésticos diagnosticados en Yucatán. *Biol.* 2001; 12: 19 – 25.
18. Zárate R. Parásitos en rumiantes. Departamento de parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UANL. En: Memoria Segundo Simposio sobre Enfermedades que afectan a los Bovinos en el Sistema Vaca/Becerro, unión Ganadera Regional de Nuevo León, México; 2003.
19. Ansar S, Penhale W, Talal N. Sex Hormones, Immune Responses and Autoimmune Diseases: Mechanisms of Sex Hormone Action. *Am J Pathol.* 1985; 121: 531-551.



# Crianza de *Oreochromis niloticus* Var chitralada en sistema bio-floc en la Empresa PRODUMAR SA, Guayaquil (Ecuador)

## Breeding of *Oreochromis niloticus* Var Chitralada in bio-floc system in the PRODUMAR SA Company, Guayaquil (Ecuador)

Manuel D. Cedano-Castro<sup>1</sup>, Angelo Lujan-Bulnes<sup>2</sup> y Hamilton Suárez Marín<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Tesista de la Escuela AP de Pesquería, Universidad Nacional de Trujillo (UNT), Trujillo, Perú. <sup>2</sup>Departamento de Pesquería, UNT. <sup>3</sup>PRODUMAR SA, Guayaquil

### RESUMEN

Se evaluó el crecimiento en peso y longitud así como los índices de producción de *Oreochromis niloticus* "tilapia" variedad chitralada en sistema de bio-floc. Se utilizó un tanque de 80 m<sup>3</sup> y se sembró a la densidad de 16 peces/m<sup>3</sup>, un peso promedio de 110.2 g y 17.8 cm. de longitud promedio, se alimentó con balanceado de 24 % de proteína tres veces diarias; durante 6 meses y medio. Como fuente de carbono se utilizó melaza, que fue adicionada para obtener una relación C:N de 15. Se utilizó un aireador a paletas de 1 Hp para mantener el bio-floc suspendido. El cultivo se desarrolló con el oxígeno promedio de 7 ± 0.4 mg/l, el TAN fue 0.03 ± 0.035 mg/l y el pH promedio fue 8 ± 0.1. Se obtuvo un peso promedio de 826.5 g y 32.7 cm de longitud promedio, la ganancia en peso fue de 3.8 g/día, el factor de conversión alimenticia obtenido fue de 1.85 y la supervivencia fue del 86.5 %.

**Palabras clave:** bio-floc, *Oreochromis niloticus*, suspensión, intensificación, calidad ambiental.

### ABSTRACT

Growth in weight and length as well as the production rates of *Oreochromis niloticus* "tilapia" variety chitralada was evaluated in bio-floc system. 80 m<sup>3</sup> tanks were used and seeded for 16 fishes/m<sup>3</sup> density, an average weight of 110.2 g and 17.8 cm. average length, balanced was fed 24% protein three times daily, for 6 months and a half. Carbon sources used was molasses, added to obtain a C:N to 15. A paddle wheel aerator of 1Hp used to keep the suspended bio-floc. The culture was grown with oxygen average of 7 ± 0.4 mg / l, the TAN was 0.03 ± 0.035 mg / l and the average pH was 8 ± 0.1. We got an average weight of 826.5 g and length 32.7 cm average weight gain was 3.8 g / day, feed conversion factor obtained was 1.85 and the survival rate was 86.5%.

**Keywords:** bio-floc, *Oreochromis niloticus*, suspension, intensification, environmental quality



## INTRODUCCIÓN

Originaria de África, gracias a su gran adaptabilidad, las tilapia, *Oreochromis niloticus*, es uno de los peces más cultivados a nivel mundial sobre todo en países tropicales y subtropicales<sup>1</sup>. El cultivo se puede realizar en estanques, jaulas y tanques, pero uno o más de estos métodos tradicionales no son sostenibles a largo plazo debido a factores relacionados con el medio ambiente y a su capacidad de garantizar al consumidor la seguridad del producto<sup>2</sup>, además, la producción acuícola mediante la ampliación de las zonas de producción y el aumento del consumo de agua son simplemente imposibles porque la explotación de tierras no agrícolas es restringida<sup>3</sup>.

En consecuencia, la única forma sostenible para aumentar la producción es en estanques extensivos o semiintensivos<sup>4</sup>. Sin embargo, existen dos importantes factores limitantes: (i) la economía y la producción de residuos y (ii) es potencialmente dañino para el medio ambiente, los cuales comprenden heces, restos de comida, los cadáveres de los peces y productos químicos como especies de nitrógeno inorgánico tóxicas<sup>5</sup>.

En los sistemas de acuicultura intensiva, la acumulación del amoníaco es generalmente el segundo factor limitante para aumentar los niveles de producción después del oxígeno disuelto<sup>6</sup>. Este factor es intrínseco de estos sistemas y no puede evitarse ya que los peces asimilan solo el 20 a 30 % de los nutrientes del alimento. El resto es excretado y típicamente acumulado en el agua, la cual a menudo se recicla a través de una serie de dispositivos especiales (mayormente biofiltros de diferentes tipos), invirtiendo energía y mantenimiento en degradar los residuos. En otras palabras aumenta el costo de producción pues se invierte dinero en el alimento y en degradar los 2/3 del alimento que no se aprovecha<sup>4</sup>.

Para poder reutilizar el agua se utilizan convencionalmente filtro de cuentas, filtros biológicos fluidizados de arena, filtros percoladores y filtros rotatorios; pero, además de estos sistemas de tratamiento de agua, existen dos posibilidades para cumplir este propósito y a su vez generar alimento para los peces, estas técnicas de doble propósito son: la técnica de tratamiento con perifitón que es la aplicable a sistemas extensivos y la técnica de bio-floc que se puede utilizar en sistemas intensivos, esta última tiene la ventaja de ser un sistema relativamente barato lo que la convierte en un método económicamente viable para la acuicultura sostenible<sup>7</sup>.

La técnica de bio-floc consiste en manipular la relación carbono/nitrógeno que está presente en el sistema<sup>8</sup>. La relación C:N se puede regular mediante la adición de fuentes de carbono como sacarosa, melaza, glicerina o acetato de calcio<sup>9,10</sup>. Por su lado, la adición de carbono orgánico puede llevarse a cabo hasta el establecimiento de la nitrificación completa o utilizarse como una estrategia para reducir rápidamente las concentraciones de TAN y nitrito. Asimismo es necesario la utilización de un separador de bio-floc eficaz para dar sostenibilidad al sistema<sup>11,12</sup>.

El control del nitrógeno es inducido por la alimentación de las bacterias con hidratos de carbono, el cual utilizan como piedra de construcción de material celular nuevo, y a través de la posterior absorción del nitrógeno del agua, para la síntesis de proteínas de las bacterias heterótrofas; este proceso es muy específico a los sistemas de bio-floc. También se debe considerar que la relación entre la adición de hidratos de carbono, la reducción del amonio y la producción de proteínas microbianas depende del coeficiente de conversión microbiana, la relación C-N en la biomasa microbiana y el contenido de carbono del material añadido<sup>4</sup>.

El bio-floc son agregados de algas, bacterias, protozoos y otras clases de material orgánicos como heces y alimento no consumido. Cada flóculo se mantiene unido por una matriz de mucosidad que es secretada por las bacterias, por microorganismos filamentosos, o por atracción electrostática. La comunidad presente en los flóculos también incluye a los animales que están pastando, como algunos zooplanctones y nematodos<sup>13</sup>. Puede contribuir con cerca del 50% de los requerimientos de proteína de los peces, esto gracias a que puede ser filtrado y cosechado por la tilapia pues llegan a medir entre 50 a 200  $\mu\text{m}$ <sup>14,15</sup>. Esta técnica además de realizar el reciclaje de los piensos, minimiza el recambio de agua los cuales son importantes contribuciones a la economía de la producción de tilapia y a la protección del medio ambiente<sup>16</sup>.

Adicionalmente, la técnica de bio-floc ofrece una solución a la dependencia de aceite y harina de pescado puesto que puede ser utilizado in situ por las especies de cultivo como fuente de alimento adicional, de esta manera se mejora la eficiencia de los nutrientes<sup>4,16,18,19</sup>. Asimismo, se puede sacar mayor provecho ofreciendo el bio-floc generado en el estanque de los peces como alimento suplementario para camarones, obteniendo un crecimiento significativamente mejor<sup>20</sup>.

Esta investigación tuvo como objetivos determinar el crecimiento en peso y longitud de *O. niloticus* Var. chitralada criada en sistema de bio-floc, los índices productivo en este tipo de sistema de cultivo, el factor de condición de los peces en cultivo, la relación Peso-Longitud y los parámetros físicos, químicos y biológicos que se presentan en este sistema.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La crianza de *Oreochromis niloticus* “tilapia” en sistema de bio-floc se desarrolló en el módulo N° 1 del Área de Hatchery de la empresa PRODUMAR S.A., localizada en el Km. 8 de la vía Duran- Tambo, en el cantón Durán, en la provincia del Guayas – Ecuador (Fig. 1).

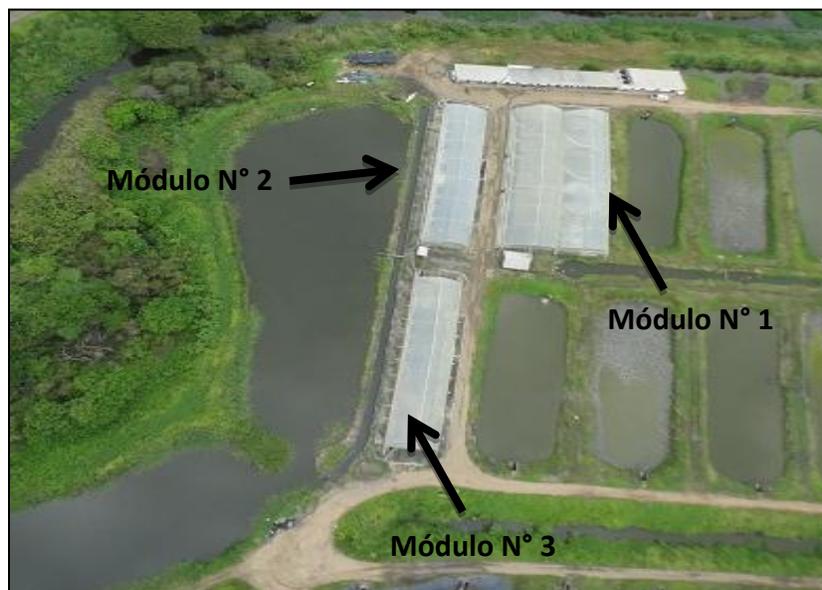


Fig. 1. Vista aérea del Área del Hatchery de la empresa PRODUMAR S.A, mostrando el módulo N° 1 que se empleó para crianza de *Oreochromis niloticus* “tilapia” en sistema de bio-floc.

Se utilizó un tanque de 10.5 m de diámetro, 1.15 m de altura exterior y con 6 % de pendiente, el drenaje era central y estaba compuesto por un tubo de PVC de 11 cm de diámetro, este tanque estaba revestido con geomembrana HDPE de 0.8 mm, el volumen de agua que se utilizó fue de 80 m<sup>3</sup> y fue regulado por un codo movable exterior (Fig. 2).

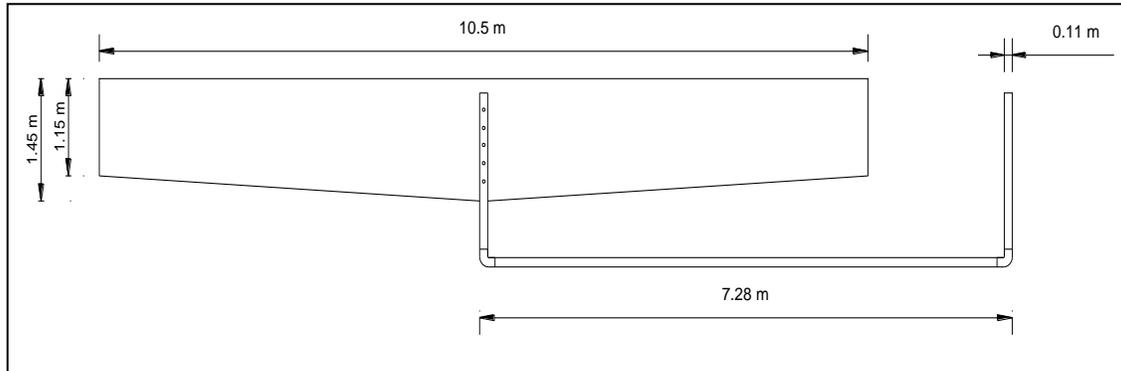


Fig. 2. Dimensiones del tanque de crianza de *O. niloticus* "tilapia" con sistema de bio-floc.

Se emplearon 1250 ejemplares de *Oreochromis niloticus* var. chitralada que se obtuvieron del Área de Pre Cría de la empresa, estos fueron transportados en dos tinas de plástico de 1 m<sup>3</sup> cada una. Asimismo, se oxigenó el agua utilizando una botella llena de oxígeno, y se distribuyó con mangueras de ½ cm de diámetro que terminaban en mangueras porosas. El transporte se realizó utilizando un tractor con carreta, luego se sembraron los peces en el tanque realizándoles un control de calidad.

Se empezó a alimentar al segundo día de siembra con balanceado marca ABA de 24 % de proteína y 6 mm de diámetro, el cual fue suministrado en tres dosis; la tasa de alimentación inicial fue de 2.5 % y fue ajustada según los resultados de los muestreos del peso y la actividad de los peces.

Los 80 m<sup>3</sup> de agua empleada en el cultivo fue desinfectada utilizando 3 kg de hipoclorito de calcio al 65 % marca SINOPEC, se neutralizó el cloro con 1.5 kg de vitamina C al 99 %, finalmente se determinó la presencia de cloro en el agua empleando Ortotolidina, esta prueba consistió en sacar una muestra de agua en un tubo de ensayo y se le agregó 8 gotas de Ortotolidina, si el agua vira a color amarillo es indicador de cloro en el agua. El agua que se empleó para recuperar el volumen perdido por evaporación fue preparada en un tanque de 20 m<sup>3</sup> revestido con geomembrana HDPE de 0.8 mm y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente. Para llevar el agua al tanque de cultivo se empleó una bomba marca Pedrollo de 0.5 Hp y 220 l/min.

Se agregó melaza como sustrato para propiciar la formación del bio-floc, la cantidad que fue añadida se determinó mediante el balance de masas expuesto por Timmons et al.<sup>9</sup>

Para dosificar la melaza se empleó un tanque de 200 L de capacidad al cual se le hizo un agujero en el centro de su base y se le acopló una manguera de ½ cm de diámetro como dosificador. Este tanque se llenó con 150 l. de agua del sistema de cultivo y se agregó la dosis de melaza; para evitar la sedimentación de la melaza se aireó la mezcla utilizando una línea de aire que se obtuvo del sistema de producción de la empresa. Se reguló la dosificación de la mezcla al sistema para que tardara entre 12 a 14 horas.

Para mantener en suspensión el bio-floc se empleó un aireador de ruedas con paletas marca Pioneer de 1 Hp. El aireador fue colocado aproximadamente a 2 m. del centro de tanque para generar un flujo rotacional dirigido al centro; el aireador fue sujetado al extremo del tanque con 4 cuerdas.

Los parámetros químicos que se registraron fueron los siguientes: se midió el NAT, Nitrito (Fig. 7a y 7b respectivamente), alcalinidad una vez al mes y CO<sub>2</sub> una vez por semana, todos estos parámetros se realizaron con pruebas colorimétricas marca LaMotte, se registraron los valores de oxígeno disuelto, a las 7 am, las 12 pm y las 5 pm, para lo cual se empleó un oxímetro de membrana marca YSI 550A, el pH fue medido semanalmente con un pHmetro digital marca Hanna.

La salinidad se midió con un monitor de salinidad marca American Marine Inc de rango de 0.00 a 200.0 mS, luego el resultado fue convertido a ppt, mediante la siguiente ecuación:



$$y = 52 * 10^{-12} x^6 - 15.61 * 10^{-9} x^5 + 19.3472 * 10^{-7} x^4 - 125.52 * 10^{-6} x^3 \\ + 575.1957 * 10^{-5} x^2 + 522.0901 * 10^{-3} x - 2.8355 * 10^{-2}$$

Se realizó el análisis cualitativo del fitoplancton y del zooplancton presentes en el bio-floc, para lo cual se utilizó un microscopio marca VanGuard.

Se realizó la medición del volumen del bio-floc mediante la sedimentación por 30 minutos en un cono IMHOFF de 1000 ml (APHA (1999) method 2540-F). Asimismo, se calculó los kilogramos por millar por día de alimento suministrado (kg/millar/día).

Se determinó la Tasa de Crecimiento Específico utilizando la siguiente fórmula:

$$TCE = \frac{[\ln(P_f) - \ln(P_i)]}{D} * 100$$

Dónde:

$\ln(P_f)$ : Logaritmo natural del peso final.

$\ln(P_i)$ : Logaritmo natural del peso inicial.

D : Días de cultivo

Se calculó el Factor de Conversión Alimenticia mediante la siguiente fórmula.

$$FCA = \frac{A}{B_f - B_0}$$

Dónde:

A: Cantidad de alimento suministrado (kg)

B<sub>f</sub>: Biomasa final (kg)

B<sub>0</sub>: Biomasa inicial (kg)

El muestreo de peso y longitud se realizó cada dos semanas, los peces fueron capturados utilizando una atarraya y la muestra consistió entre 70 a 100 ejemplares; para el muestreo en peso se empleó una balanza electrónica marca OHAUS de 3 kg de capacidad y 1 g. de sensibilidad, para el muestreo de longitud se empleó un ictiómetro de madera. Para evitar el estrés y mejorar la manipulación de los peces se empleó el anestésico Aquí S, la dosificación se realizó mediante las especificaciones del productor, asimismo se emplearon guantes de lana para manipular los peces.

Para el análisis de los datos obtenidos del muestreo se empleó el programa Microsoft Excel 2010, con lo cual se determinó los promedios de peso y longitud, a su vez se determinó la relación peso-longitud aplicando el modelo de regresión potencial

## RESULTADOS

La crianza de *Oreochromis niloticus* “tilapia” var. chitralada en sistema de bio-floc se desarrolló durante 182 días, iniciando con 1250 peces de 110.2 g. de peso y 17.8 cm de longitud promedio, la biomasa inicial fue de 137.8 kg. Al finalizar el cultivo de *O. niloticus* se obtuvo 1081 peces de 826.5 g de peso y una longitud de 32.7 cm. promedio, esto hace una carga final de 11.2 kg/m<sup>3</sup> y una densidad de 13.5 ind/m<sup>3</sup>, la biomasa final fue de 893.4 kg

A lo largo de la crianza de *O. niloticus* en sistema de bio-floc se utilizó 1396 kg de alimento balanceado con 24 % de proteína y se obtuvo un FCA de 1.85, asimismo la cantidad de alimento utilizado por millar de peces a lo largo de todo el ciclo de crianza fue de 7.096 (kg/millar/día).

*O. niloticus* en este sistema creció a un ritmo general de 4.15 g/día, con una tasa de crecimiento específico de 1.113 %. La supervivencia obtenida de *O. niloticus* en sistema de bio-floc fue de 86.5 %, se



presentó mayor mortalidad las tres primeras semanas, 8.9 %, 1.3 % y 1.3 % respectivamente, después de este periodo la mortalidad semanal fue menor del 0.002%.

Como resultado de los muestreos realizados cada dos semanas (Tabla 1) se obtuvo que el crecimiento en peso de *O. niloticus* se ajusta en un 97.8 % a la siguiente curva (Fig. 3). Asimismo, se obtuvo que el crecimiento en longitud de *O. niloticus* se ajusta en un 98.1 % a la siguiente curva (Fig. 4).

El buen estado de salud de *O. niloticus* se vio reflejado en el factor de condición obtenido que fue de 2.3. Las tallas de cosecha tanto en peso y longitud fueron similares indicándolo así los coeficientes de variación del peso y de la longitud obtenidos que fueron de 30% y 10 % respectivamente.

El análisis de la relación peso-longitud indican que estas variables se relacionan en un 99.5 % por la siguiente regresión potencial (Fig. 5):

Se utilizó 80 m<sup>3</sup> de agua, y para reponer el volumen de agua que se evaporó durante todo el ciclo de crianza se emplearon 120 m<sup>3</sup> de agua, consecuentemente se gastó 4.5 L de agua para producir 1 kg de tilapia. Para mantener este nivel de NAT, mantuvo una relación C/N de 15, consumiéndose 1160 L de melaza. El coeficiente de alometría fue de 3.1 (Figs. 6 y 7)

La cantidad de bio-floc fue aumentando conforme transcurría el tiempo de crianza de *O. niloticus*, llegando a ser de 230 ml/l. La relación entre el CO<sub>2</sub> y la cantidad de bio-floc presente en el sistema se explica en un 96.3 % (Figs. 8, 9 y 10)

Cualitativamente el bio-floc estuvo conformado por: microalgas, protozoarios, rotíferos, copépodos, gastrotricos y anélidos. Se identificaron tres especies de clorofitas: *Pediastrum dúplex*, *Coelastrum sp.*, *Scenedesmus quadricauda* y tres de bacilariofitas: *Cyclotella sp.*, *Synedra sp.*, *Navicula sp.* Se identificaron seis grupos de zooplanctontes que conformaban el bio-floc: protozoarios, cladóceros, rotíferos, copépodos, gastrotricos y anélidos (Figs. 11 y 12).

**Tabla 1.** Pesos y longitudes promedios de *O. niloticus* criada en sistema de bio-floc

Días de cultivo	N° muestreo	Longitud (cm)	Peso (g)
0	1	17.8	110.2
14	2	18.2	136.4
28	3	19.4	174.1
42	4	21.6	219.4
56	5	22.6	273.7
70	6	23.7	316.8
84	7	24.7	358.9
98	8	26.2	406.2
112	9	27.8	487.6
126	10	29.2	566.8
140	11	30.4	664.0
154	12	31.8	748.0
168	13	32.4	799.2
182	14	32.7	826.5

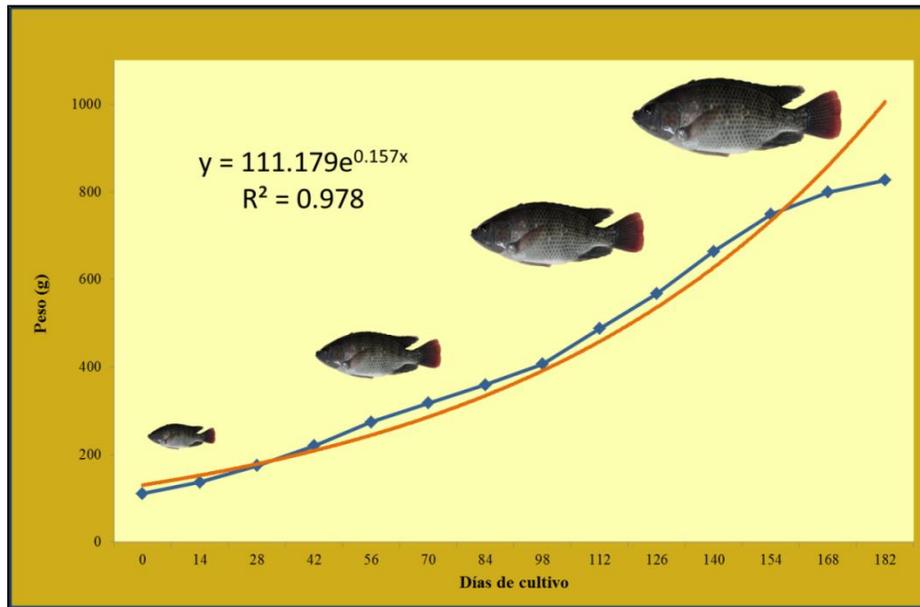


Fig. 3. Crecimiento en peso de *Oreochromis niloticus* variedad chitralada “tilapia” criada en sistema de bio-floc.

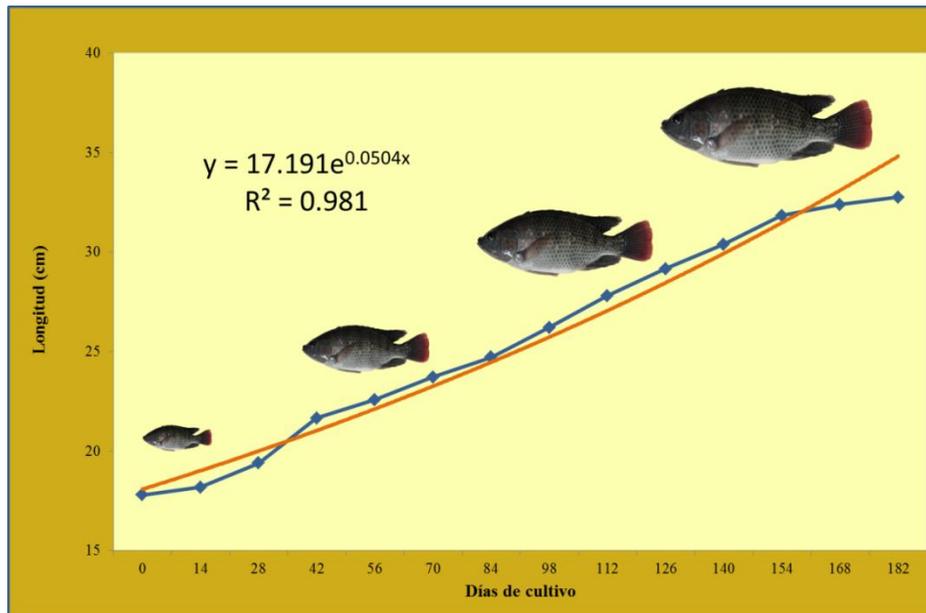


Fig. 4. Crecimiento en longitud de *Oreochromis niloticus* variedad chitralada “tilapia” criada en sistema de bio-floc.

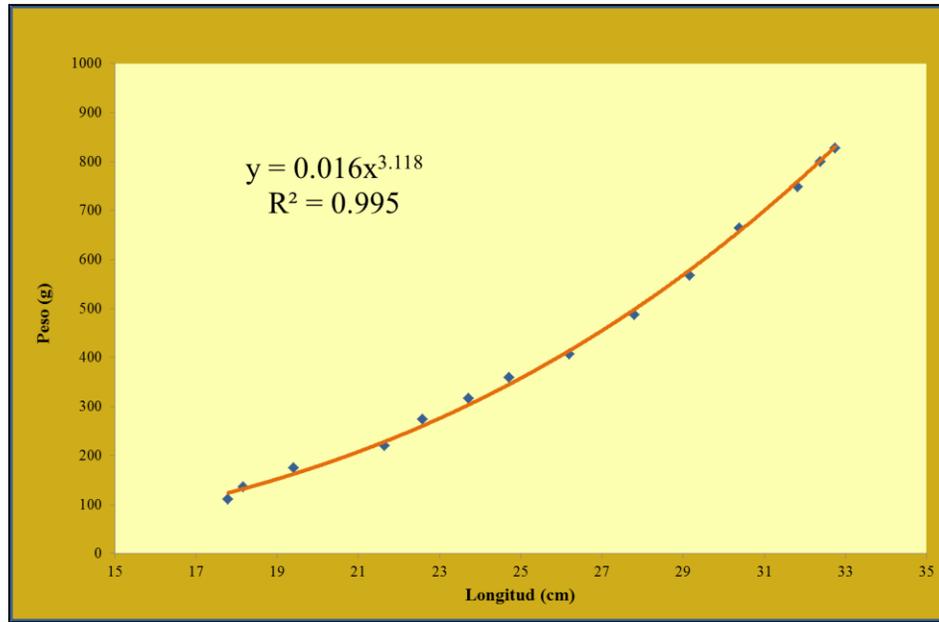


Fig. 5. Relación Peso-Longitud de *Oreochromis niloticus* variedad chitralada “tilapia” criada en sistema de bio-floc.

Tabla 2. Parámetros físicos y químicos de *Oreochromis niloticus* criada en sistema de bio-floc

	T (°C)	pH	O <sub>2</sub> (mg/l)	CO <sub>2</sub> (mg/l)	Amonio (mg/l)	Nitrito (mg/l)	Salinidad (ups)	Alcalinidad (mg/l CaCO <sub>3</sub> )
Prom	25.5	8	6.8	47.6	0.025	0.013	2.7	185
Máx	26.4	8.1	7.4	73	0.2	0.05	2.8	197
Mín	24.2	7.9	5.7	30	0.0	0.00	2.6	173.4
DS	0.6	0.1	0.4	15.9	0.035	0.02	0.07	6.87



Fig. 6. Variación del oxígeno durante la crianza de *Oreochromis niloticus* en sistema de bio-floc.



Fig. 7. Variación de la temperatura durante la crianza de *Oreochromis niloticus* en sistema de bio-floc.



Fig. 8. Variación del CO<sub>2</sub> durante la crianza de *Oreochromis niloticus* en sistema de bio-floc.

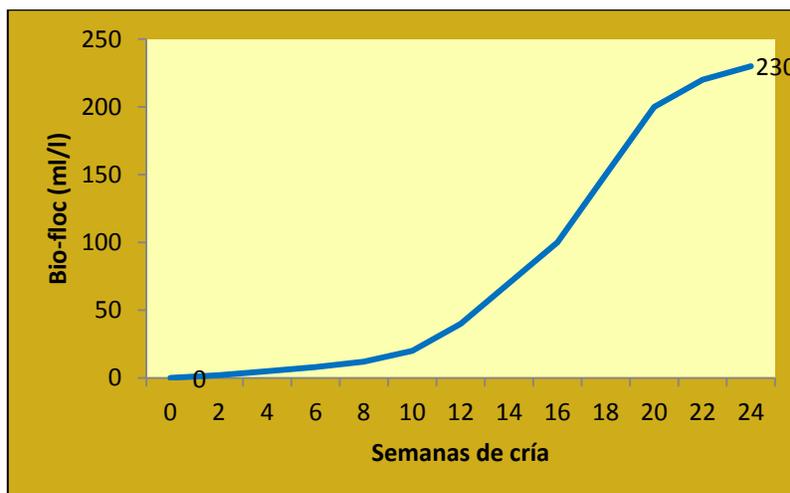


Fig. 9. Variación del bio-floc durante la crianza de *Oreochromis niloticus* en sistema de bio-floc.

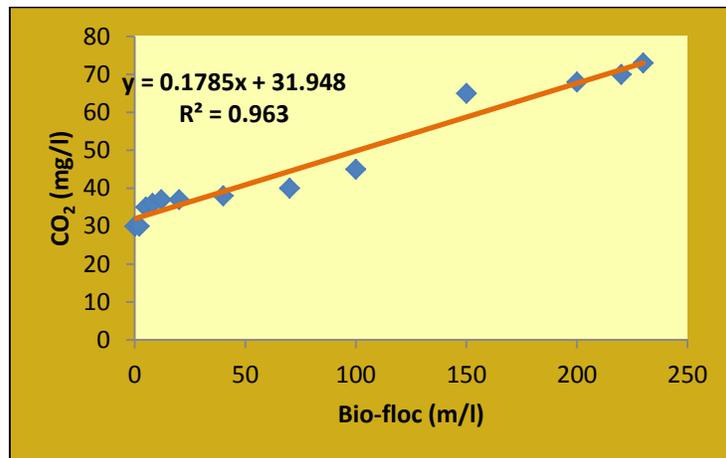


Fig. 10. Relación entre el bio-floc y el CO<sub>2</sub> en el sistema durante la crianza de *Oreochromis niloticus* en sistema de bio-floc.

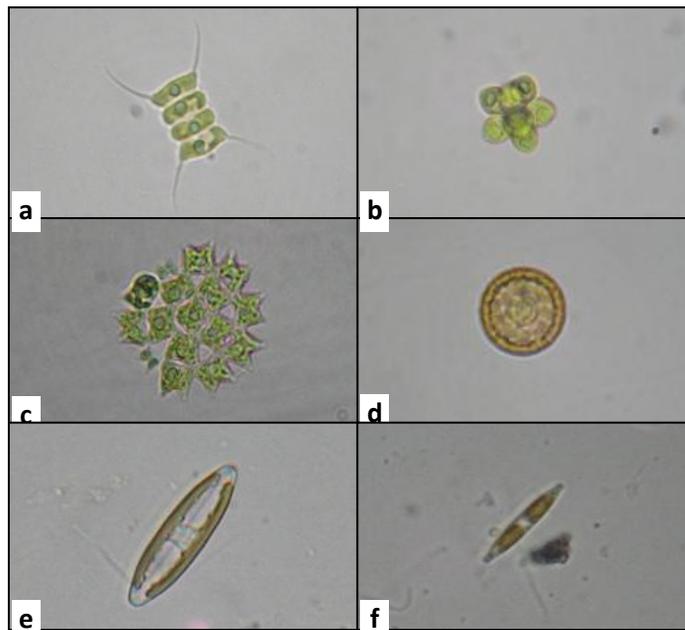


Fig. 11. Fitoplancton (40X) presente en la crianza de *Oreochromis niloticus* "tilapia" en sistema de bio-floc, a) *Scenedesmus quadricauda*, b) *Coelastrum* sp., c) *Pediastrum duplex*, d) *Cyclotella* sp., e) *Navicula* sp. y f) *Synedra* sp..



Fig. 12. Zooplancton presente en la crianza de *Oreochromis niloticus* “tilapia” en sistema de bio-floc, a) protozoario 40X, b) cladóceros 10X, c) rotífero 10X, d) copépodo 5X, e) gastrotrico 40X y f) nemátodo 5X.

## DISCUSIÓN

El crecimiento de *O. niloticus* variedad Chitralada “tilapia” cultivada en sistema de bio-floc fue de 4.15 g/día, lo que es mayor a lo obtenido por Rakocy<sup>21</sup> de 4 a 3.2 g/día, adicional a esto debemos recalcar que este investigador utilizó alimento con 32 % de proteínas, mientras que en este experimento se utilizó alimento con 24 % de proteínas. Adicionalmente, el FCA que fue de 1.85 está entre los rangos de 1.8 a 2.2 con el mismo sistema de cultivo<sup>21</sup>.

El alimento consumido por millar de peces durante el periodo de cría fue de 7.096 (kg/millar/día), este dato es fundamental para poder estimar gastos de balanceado para posibles producciones a esta escala. La supervivencia obtenida fue del 86.5 %, lo que es similar a lo obtenido previamente<sup>21</sup> de 78.9% a 99.7%, pero la causa por la que se obtuvo esta baja supervivencia en el experimento fue la mortalidad ocurrida en las 3 primeras semanas de cultivo; en la semana 0 fue de 8.9 % de mortalidad esto debido a que los peces fueron sujetos de stress por la pesca, transporte y siembra. Luego de esto la mortalidad semanal fue menor de 0.002 %.

Se observó un crecimiento en peso y longitud lento al final de la crianza, lo que puede estar relacionado con la alta cantidad de bio-floc presente en el sistema que fue de 230 ml/l. El factor de condición obtenido fue de 2.3 el cual está en el rango reportado por Timmons et al.<sup>2</sup>, que varía entre 2.08 y 2.5; este valor refleja el buen estado fisiológico de los peces.

Esta crianza experimental está catalogado como super-intensivo<sup>22</sup>, dado que la producción que se puede obtener extrapolando los resultados a una hectárea serían de 111.8 ton/ha; asimismo el factor de conversión obtenido de 1.85, que está en el rango reportado por ellos, de 1.6 a 2.0, pero cabe resaltar que se usó alimento con 24 % de proteína lo que genera menores costos de producción en comparación al uso de alimento balanceado de 28 al 40 % de proteína usado para este tipo de sistemas.



Con respecto al cálculo que se realizó para determinar la cantidad de carbono necesario, se despreció la cantidad de carbono que aporta el alimento y que se excreta en el agua<sup>16</sup>, este carbono aportado por el alimento sirvió como margen de seguridad para mantener el NAT bajo.

Para realizar el cálculos de la cantidad de melaza a emplear se asumió que la melaza contenía 24 % de carbono, este dato fue tomado de los análisis realizados por la empresa para su adquisición.

Según Avnimelech<sup>4</sup> se necesita de 2 a 10 m<sup>3</sup> de agua para producir 1 kg de pescado, en esta investigación se necesitó 4.5 l de agua para producir 1 kg de pescado, lo que representa el 2.3\*10<sup>-3</sup> o el 4.5\*10<sup>-4</sup> %, esto no deja lugar a duda sobre el beneficio ambiental que aporta esta técnica para la acuicultura.

Se obtuvo 230 ml/l de bio-floc al final de la crianza de *O. niloticus*, el CO<sub>2</sub> fue de 47.6 ± 15.9 mg/l y la alcalinidad fue de 185 ± 6.9 mg/l de CaCO<sub>3</sub>, este último parámetro vario muy poco durante el tiempo de crianza, asimismo estos resultados se ajustan a lo manifestado por Timmons et al. (2009) quien asevera que la biomasa bacteriana es 40 veces mayor a la generada en el proceso de nitrificación, esto guarda relación con la acumulación de los sólidos en el sistema conforme van transcurriendo los días de cría, también se consume poca alcalinidad y se generan altos niveles de dióxido de carbono.

El NAT promedio durante la crianza de *O. niloticus* "tilapia" fue de 0.03 ± 0.035 mg/l, lo que está en el rango que se ha reportado<sup>23</sup> de 0.004 a 0.05 para obtener un buen crecimiento en *O. niloticus*, asimismo está por debajo de lo recomendado por Avnimelech<sup>16</sup> que manifiesta el buen funcionamiento del sistema con un NAT de 0.5 mg/l, esta cantidad de NAT refleja en buen funcionamiento del sistema de producción.

El valor del pH en el que se desarrolló la crianza fue de 8.1 ± 0.2, siendo este valor un poco mayor al recomendado previamente<sup>23</sup> que esta entre 7 y 8 para un buen crecimiento de *O. niloticus*. El nitrito promedio registrado fue de 0.013 mg/l, este valor de nitrito es consecuencia de un sistema de bio-floc maduro, esto coincide con Timmons et al.<sup>2</sup> quienes manifiestan que los sistema heterótrofos puros tiene la característica de un valor de nitrito bajo.

La salinidad a la que se desarrolló la crianza en sistema de bio-floc fue de 2.7 ups, a su vez se ha manifestado que para obtener crecimientos óptimos en tilapia se debe de tener valores de salinidad menores a 15 ups, por lo cual este experimento no tuvo ningún problema en cuanto a crecimiento de *O. niloticus* originada por esta variable<sup>24</sup>.

Se encontraron seis grupos de organismos en el bio-floc los cuales son protozoarios, Rotíferos, copépodos, cladóceros, gastrotricos y nematodos, estos grupos aparecieron paulatinamente en el sistema de cultivo, primero aparecieron los protozoarios luego los gastrotricos, seguidos de los rotíferos y cladóceros, luego los nematodos y finalmente aparecieron los copépodos, asimismo se encontraron mas grupo que los reportados previamente<sup>14</sup> los cuales solo reportan protozoarios, rotíferos y oligoquetos

## CONCLUSIONES

- *Oreochromis niloticus* alcanzó los 826.5 g con un factor de conversión alimenticia de 1.85.
- *O. niloticus* creció 4.15 g/día, y se obtuvo una carga de 11.2 kg/m<sup>3</sup>, al final de la investigación.
- Se obtuvo una supervivencia de 86.5 %, aumento de la relación C:N hasta 15, 01 kg de *O. niloticus* con 4.5 l de agua, manteniéndose los parámetro químico en niveles óptimos para el buen crecimiento de *O. niloticus* (O<sub>2</sub> de 6.8 ppm, el NAT 0.025 mg/l, el nitrito 0.013 mg/l, el pH de 8, la alcalinidad 185 mg/l de CaCO<sub>2</sub>, la temperatura 25.5 °C y la salinidad 2.7 ups).
- El empleo de la técnica del bio-floc protege el medio ambiente de los desechos generados por la acuicultura.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Poot C, Novelo R, Hernández M. ABC en el cultivo integral de Tilapia. Centro de Estudios Tecnológicos del Mar 02 y Fundación Produce Campeche. 2009.
2. Timmons M, Ebeling J, Piedrahita R. Acuicultura en Sistemas de Recirculación. USA: Edit. LIMUSA. 2009.
3. FAO. Estado Mundial de la Acuicultura 2006. Servicio de Gestión y Conservación de la Acuicultura. Dirección de Ordenación de la Pesca y la Acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. 2007.



4. Avnimelech Y, Verdegem M, Kurup M, Keshavanath P. Sustainable Land based Aquaculture: Rational Utilization of Water, Land and Feed Resources. *Mediterranean Aquaculture J* 2008; 1(1): 45-55.
5. Marine Aquaculture Task Force. Sustainable Marine Aquaculture: Fulfilling the Promise; Managing the Risks. 2007.
6. Ebeling J, Timmons M, Bisogni J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* 2006; 257: 346-358.
7. Crab R, Avnimelech Y, Defoirdt T, Bossier P, Verstraete W. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture* 2007; 270: 1-14.
8. Taw N. Biofloc technology expanding at white shrimp farms; biofloc systems deliver high productivity with sustainability. *Global Aquaculture advocate*. May/June 2010: 20-22. USA.
9. Kuhn D, Lawrence A. Biofloc Technology Options For Aquaculture In Situ, Ex-Situ Systems Improve Water Quality, Provide Nutrition. *Global Aquaculture advocate*. July/August 2012: 20-21. USA.
10. Schneider O, Sereti V, Eding H, Verreth J. Molasses as C source for heterotrophic bacteria production on solid fish waste. *Aquaculture* 2006; 261: 1239-1248.
11. Asaduzzaman M, Wahab M, Verdegem M, Huque S, et al. C/N ratio control and substrate addition for periphyton development jointly enhance freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* production in ponds. *Aquaculture* 2008; 280: 117-123.
12. Nootong K, Pavasant B, Powtongsook S. Effects of Organic Carbon Addition in Controlling Inorganic Nitrogen Concentrations in a Biofloc System. *J World Aquacul Soc* 2011; 42(3): 339-346.
13. Hargreaves J. Biofloc Production Systems for Aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center. SRAC Publication No. 4503. USA. 2013.
14. Azim M, Little D, Bron J. Microbial protein production in activated suspension tanks manipulating C:N ratio in feed and the implications for fish culture. *Bioresource Technol* 2007; 99: 3590-3599.
15. Kuhn D, Boardman G, Flick G, Lawrence A. Suspended-growth biological processes clean RAS wastewater. *Global Aquaculture advocate*. January/February 2010: 69-71. USA.
16. Avnimelech Y. Tilapia Production Using Biofloc Technology Saving Water, Waste Recycling Improves Economics. *Global aquaculture advocate* May/June 2011: 66-68. USA.
17. De Schryver P, Crab R, Defoirdt T, Boom N, Verstraete W. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture* 2008; 277: 125-137.
18. Kuhn D, Boardman G, Lawrence A, Marsh L, Flick G. Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed. *Aquaculture* 2009; 296: 51-57.
19. Ray A, Venero J, Browdy C, Leffler J. Simple Settling Chambers Aid Solids Management In Biofloc System. *Global Aquaculture advocate*. July/August 2010: 28-30. USA.
20. Kuhn D, Boardman G, Craig S, Flick G, Mclean E. Use of Microbial Floes Generated from Tilapia Effluent as a Nutritional Supplement for Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in Recirculating Aquaculture Systems. *J World Aquacul Soc* 2008; 39(1): 72-82.
21. Rakocy JE, Danaher JJ, Bailey DS, Shultz RC. Development of a Biofloc System for the Production of Tilapia. *Aquaculture* 2008; 277: 138-145
22. Hsien S, Quintanilla M. Manual sobre reproducción y cultivo de tilapia. Centro de desarrollo de la pesca y la acuicultura (CENDEPESCA). El Salvador. 2008.
23. El-Sherif, MS, EL-Feky AM. Performance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fingerlings. I. Effect of pH. *Intern J Agricul & Biol* 2009; 29: 31-42
24. Mena A, Sumano H, Macías R. Efecto de la salinidad en el crecimiento de tilapia híbrida *Oreochromis mossambicus* (Peters) x *Oreochromis niloticus* (Linnaeus), cultivadas bajo condiciones de laboratorio. División de Agricultura. Sinaloa.México. 2001.



## 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.