

Editora

DOLLY MONTOYA CASTAÑO, Ph. D.

Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional de Colombia

CONSEJO EDITORIAL

GABRIEL OSVALDO GUTKIND, Ph.D

Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires, Argentina

GUSTAVO BUITRAGO HURTADO, MSc

Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional de Colombia

ÓSCAR CASTELLANOS D., Ph. D.

Facultad de Ingeniería
Universidad Nacional de Colombia

ÓSCAR ALZATE, Ph. D.

Department of Neurobiology
Duke University Medical Center, EE.UU.

ENRIQUE GALINDO, Ph. D.

Departamento de Bioingeniería
Universidad Autónoma de México, México

RAFAEL RANGEL ALDAO, Ph. D.

Departamento de Tecnología y Procesos
Biológicos y Bioquímicos
Universidad Simón Bolívar, Venezuela

MARÍA TERESA REGUERO R., MSc

Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional de Colombia

JORGE MAYER, Ph. D.

Golden Rice Project - Manager
University of Freiburg, Alemania

Directora Ejecutiva

Jaqueline Ramírez Piraján, MSc
Universidad Nacional de Colombia

Con el apoyo de:



COLCIENCIAS
C O L O M B I A

Nombre de la Obra:

"Microorganismos promotores del crecimiento vegetal
de la cepa al producto."

Autor:

Ivonne Gutiérrez Rojas, Luis Sarmiento -
Biocultivos S.A., Colombia.

Lugar:

Universidad Nacional de Colombia,
Sede Bogotá

CONSEJO ASESOR

ANDRÉS ILLANES, MSc

Escuela de Ingeniería Bioquímica
Universidad Católica de Valparaíso, Chile

ALLAN RUSSELL, Ph. D.

McGowan Institute for Regenerative Medicine
Universidad de Pittsburgh, EE.UU.

JORGE OSSA, Ph. D.

Corporación Biogénesis
Universidad de Antioquia, Colombia

ARCADY SINITSYN, Ph. D.

Departamento Cinética Enzimática
Universidad Estatal de Moscú, Rusia

JUAN GENTINA, MSc

Escuela de Ingeniería Bioquímica
Universidad Católica de Valparaíso, Chile

JOSÉ SÁNCHEZ-SERRANO, Ph. D.

Centro Nacional de Biotecnología
Madrid, España

FABIO A. ARISTIZÁBAL GUTIERREZ, Ph.D.

Instituto de Biotecnología,
Departamento de Farmacia
Universidad Nacional de Colombia

JENNY DUSSAN, Ph. D.

Centro de Investigaciones Microbiológicas
Universidad de los Andes, Colombia

RUBÉN TORRENEGRA, Ph. D.

Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad
Javeriana, Colombia

RODRIGO LÓPEZ, Ph.D

EMBL-EBI
European Bioinformatics Institute, UK

NINFA MARÍA ROSAS GARCÍA, PhD

Centro de Biotecnología Genómica
Instituto Politécnico Nacional, México

CAMILO LÓPEZ, Ph.D.

Departamento de Biología
Universidad Nacional de Colombia

OLIVIER THOMAS, Ph.D

Faculté des Sciences
University of Nice, France

RODOLFO QUINTERO, Ph. D.

Programa de Biotecnología del Petróleo
Instituto Mexicano del Petróleo, México

YOAV BASHAN, Ph. D.

Departamento de Microbiología
Centro de Investigaciones Biológicas del
Noroeste, México

Esta publicación ha sido indexada en:

- Chemical Engineering and Biotechnology Abstracts- Verfahrenstechnische Berichte - CEABA - VtB (Alemania)
- Sistema de Información de publicaciones científicas seriadas en América Latina, El Caribe, España y Portugal (LATINDEX)
- Índice Nacional de publicaciones seriadas, científicas y tecnológicas (PUBLINDEX)
- Red de Revistas científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal (REDALYC)
- Índice de revistas latinoamericanas en ciencias PERIÓDICA de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) <http://www.snsr.mx/bidimas/periodica.html>
- Base de datos bibliográfica de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) <http://dgb.unam.mx/periodica.html>
- Informe Académico. International Thomson Editores S.A. de C.V. Thomson Gale
- LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde)
- DIALNET (Universidad de la Rioja- España)
- CAB Abstracts and Global Health (Wallingford, UK)
- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, España)
- Swets Information Services B.V. (The Netherlands)
- INIST- Centre National de la Recherche Scientifique
- Institut de L'Information Scientifique et Technique (France)

Coordinación Académica



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA**
SEDE BOGOTÁ

Público objetivo

Investigadores, estudiantes y profesionales
de las disciplinas que se desarrollan
en torno a la biotecnología.

La *Revista Colombiana de Biotecnología* es una
publicación interinstitucional, especializada
en la divulgación de desarrollos científicos
y técnicos, así como otros temas relacionados
con las diversas áreas de la biotecnología.

Corrección de estilo y diagramación

Dora Álvarez S.

Impresión

Fundación Cultural Javeriana de Artes Gráficas
Javegraf

Periodicidad:

semestral

La *Revista Colombiana de Biotecnología* no se responsabiliza por las ideas emitidas por los autores.

Los artículos que aparecen en esta revista pueden ser reproducidos citando la fuente.

Suscripciones, envío de trabajos, canjes o comentarios:
 Instituto de Biotecnología /Universidad Nacional de Colombia.
 Ciudad Universitaria. Edificio Manuel Ancízar.
 A.A. 14490 de Bogotá. Tel. [5-71] 316-5450 / 316-5000 (ext. 16981) - Fax: [5-71] 316-5415
 Correo electrónico: revcbib_bog@unal.edu.co

CONTENIDO

EDITORIAL

La agricultura sostenible un reto para la microbiología del suelo5

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

- Asociaciones de marcadores moleculares con la resistencia a enfermedades, caracteres morfológicos y agronómicos en familias diploides de papa (*Solanum tuberosum* L.)
Julio Gabriel, Silene Veramendi, Linett Pinto, Leslie Pariente, Ada Angulo.7
- Interacciones de las proteínas disulfuro isomerasa y de choque térmico Hsc70 con proteínas estructurales recombinantes purificadas de rotavirus
Luz Y. Moreno, Carlos A. Guerrero, Orlando Acosta 23
- Evaluación del tratamiento anaerobio de las aguas residuales de una comunidad universitaria
Sandra Crombet Grillet, Arelis Abalos Rodríguez, Suyén Rodríguez Pérez, Norma Pérez Pompa. 39
- Comparación del potencial oxidativo de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, en un proceso de biodesulfurización de carbón
María Prada Fonseca, Gerardo Caicedo Pineda, Marco Márquez Godoy 47
- Efecto de las PGPB sobre el crecimiento *Pennisetum clandestinum* bajo condiciones de estrés salino
Diana Beatriz Sánchez López, Jazmín Vanessa Pérez Pazos, Hilda Adriana David Hinestroza 55
- Efecto de carbón tipo lignito sobre el crecimiento y producción de pigmentos de *Arthrospira platensis*
Massiel Vanesa Rivera Gonzalez, Liliana Gómez Gómez, Juan Guillermo Cubillos Hinojosa, Arnaldo Peralta Castilla. 63
- Evaluación de tres promotores constitutivos para la expresión GUS en arroz (*Oryza sativa* L., cv. J-104)
Maylín Pérez Bernal, Daymí Abreu Remedios, Onel Valdivia Pérez, Magalis Delgado Rigo, Raúl Armas Ramos. 71
- Desempeño del crecimiento y sobrevivencia de larvas de *Oreochromis ssp.* utilizando un probiótico en el alimento
Lara Mantilla C.†, J. Vellojín Furnieles, D. García Peréz, V. Pertúz Buelvas. 80
- Caracterización molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de plantas de ñame de la Costa Atlántica Colombiana utilizando la técnica "DNA Amplification Fingerprinting (DAF)"
Natalia Giraldo Marroquín, Silvia Lizette Bustamante Rodríguez, Yeimy Alexandra Pinzón Gutiérrez, Gustavo Buitrago Hurtado. 85
- Detección serológica y molecular del *Potato virus X (PVX)* en tubérculos-semilla de papa (*Solanum tuberosum* L. y *Solanum phureja* Juz. & Bukasov) en Antioquia, Colombia
Daniela García Ruíz, Manuel Andres Olarte Quintero, Pablo Gutiérrez Sánchez, Mauricio Marín Montoya 94
- Efecto de la cisteína en un proceso de biodesulfurización de carbones en lecho empacado
Gerardo Andrés Caicedo Pineda, Marco Antonio Márquez Godoy 102

ARTÍCULO DE REVISIÓN

- Tratamiento de cáncer de seno y farmacogenética
Yeimy Viviana Ariza Márquez, Ignacio Briceño Balcázar, Fabio Ancízar Aristizábal. 111
- Procedimientos actuales para la extracción y purificación de flavonoides cítricos
Andrés Alejandro Damián-Reyna, Juan Carlos González-Hernández, Ma. del Carmen Chávez-Parga, 125
- Revisión del agave y el mezcal
Elia Pérez Hernández, Ma. del Carmen Chávez Parga, Juan Carlos González Hernández 138
- Aproximación al estudio de libertad de operación para una línea transgénica de arroz en Colombia
Cristina Diazgranados, Viviana Hincapié Rojas, Alejandro Chaparro-Giraldo 155

ARTÍCULO CORTO

Evaluación inicial de parámetros de campo en un biodigestor anaeróbico para el tratamiento de aguas residuales <i>María Antonieta Sánchez Góngora, Ignacio Enrique Peón Escalante, Teresita Cardona Juárez, Lesli Ortega Arroyo, Guillermo Urriolagoitia Calderón</i>	163
INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES	178

CONTENIDO

EDITORIAL

Sustainable agriculture a challenge for soil microbiology	5
---	---

RESEARCH ARTICLES

Associations of molecular markers with diseases resistance, morphological and agronomic characters in potato diploid families (<i>Solanum tuberosum</i> L.) <i>Julio Gabriel, Silene Veramendi, Linett Pinto, Leslie Pariente, Ada Angulo</i>	7
Protein disulfide isomerase and heat shock cognate protein 70 interactions with rotavirus structural proteins using their purified recombinant versions <i>Luz Y. Moreno, Carlos A. Guerrero, Orlando Acosta</i>	23
Evaluation of the anaerobic treatment of domestic wastewaters of a university campus <i>Sandra Crombet Grillet, Arelis Abalos Rodríguez, Suyén Rodríguez Pérez, Norma Pérez Pompa</i>	39
Comparison of the oxidative potential of <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , in biodesulphurization process of coal <i>María Prada Fonseca, Gerardo Caicedo Pineda, Marco Márquez Godoy</i>	47
PGPB effect on the growth <i>Pennisetum clandestinum</i> under salt stress <i>Diana Beatriz Sánchez López, Jazmín Vanessa Pérez Pazos, Hilda Adriana David Hinestroza</i>	55
Effect of coal type lignite on growth and production of pigments of <i>Arthrospira platensis</i> <i>Massiel Vanesa Rivera Gonzalez, Liliana Gómez Gómez, Juan Guillermo Cubillos Hinojosa, Arnaldo Peralta Castilla</i>	63
Assessment three constitutive promoters for GUS expression in rice (<i>Oryza sativa</i> L., var. J-104) <i>Maylin Pérez Bernal, Daymí Abreu Remedios, Onel Valdivia Pérez, Magalis Delgado Rigo, Raúl Armas Ramos</i>	71
Growth performance and survival of <i>Oreochromis</i> ssp. larvae using a probiotic in the feed <i>Lara Mantilla C.†, J. Vellojín Furnieles, D. García Pérez, V. Pertúz Buevas</i>	80
Molecular characterization of <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> isolated from yam plants of Colombia Atlantic Coast using DNA Amplification Fingerprinting technique (DAF) <i>Natalia Giraldo Marroquín, Silvia Lizette Bustamante Rodríguez, Yeimy Alexandra Pinzón Gutiérrez, Gustavo Buitrago Hurtado</i>	85
Serological and molecular detection of <i>Potato virus X</i> (PVX) in seed potato tubers (<i>Solanum tuberosum</i> L. and <i>Solanum phureja</i> Juz. & Bukasov) from Antioquia, Colombia <i>Daniela García Ruíz, Manuel Andres Olarte Quintero, Pablo Gutiérrez Sánchez, Mauricio Marín Montoya</i>	94
Effect of cysteine in a biodesulfurization process of packed-bed coals <i>Gerardo Andrés Caicedo Pineda, Marco Antonio Márquez Godoy</i>	102
REVIEW ARTICLE	
Treatment of breast cancer and pharmacogenetics <i>Yeimy Viviana Ariza Márquez, Ignacio Briceño Balcázar, Fabio Ancízar Aristizábal</i>	111
Current procedures for extraction and purification of citrus flavonoides <i>Andrés Alejandro Damián-Reyna, Juan Carlos González-Hernández, Ma. del Carmen Chávez-Parga</i>	125

Review of agave and mezcal <i>Elia Pérez Hernández, Ma. del Carmen Chávez Parga, Juan Carlos González Hernández</i>	138
Approach study of freedom to operate for transgenic line rice in Colombia <i>Cristina Diazgranados, Viviana Hincapié Rojas, Alejandro Chaparro-Giraldo</i>	155

SHORT ARTICLES

Preliminary evaluation of field parameters at an anaerobic biodigester designed for the treatment of wastewater <i>María Antonieta Sánchez Góngora, Ignacio Enrique Peón Escalante, Teresita Cardona Juárez, Lesli Ortega Arroyo, Guillermo Urriolagoitia Calderón</i>	163
AUTHOR INSTRUCTIONS FOR THE REVISTA COLOMBIANA DE BIOTECNOLOGÍA	180



La agricultura sostenible un reto para la microbiología del suelo

Sustainable agriculture a challenge for soil microbiology

*Nubia Moreno Sarmiento**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57828

Los suelos: una base sólida para la vida, fue el tema de la celebración del año 2015, que la Asamblea General de la ONU, decide declarar como Año Internacional de los Suelos, al considerar que estos constituyen el fundamento del desarrollo agrícola, de las funciones esenciales de los ecosistemas y de la seguridad alimentaria. Es por lo tanto un elemento clave para el mantenimiento de la vida sobre la Tierra. Durante ese año se realizaron varias acciones que contribuyeron con la concientización de su problemática y la protección del recurso suelo. Una de ellas fue que la FAO, revisó y publicó en junio de 2015, la Carta Mundial de los Suelos (elaborada originalmente en 1982).

La Carta Mundial de los Suelos Revisada, a manera de preámbulo cita:

1. Los suelos son fundamentales para la vida en la Tierra, pero las presiones sobre los recursos de suelos están alcanzando límites críticos. Una gestión cuidadosa del suelo constituye un factor esencial de la agricultura sostenible y proporciona también un resorte valioso para regular el clima y un camino para salvaguardar los servicios ecosistémicos y la biodiversidad.
2. En el documento final de la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo Sostenible, celebrada en Río de Janeiro (Brasil) en junio de 2012, "El futuro que queremos", se reconoce la importancia económica y social de una buena ordenación de la tierra, incluido el suelo, y en particular su contribución al crecimiento económico, la diversidad biológica, la agricultura sostenible, la seguridad alimentaria, la erradicación de la pobreza, el empoderamiento de la mujer, las medidas para hacer frente al cambio climático y el aumento de la disponibilidad de agua.

Estas ideas dan cuenta de la importancia que hoy día se le reconoce al suelo, mismo que había sido desconocido como parte fundamental en la agricultura tradicional, y sobre el cual se concebía como un sustrato inerte donde se llevaban a cabo procesos vivos únicamente debido a la presencia de las plantas. Hoy día, el suelo se define como la capa más superficial de la corteza terrestre formada por partículas minerales, materia orgánica, agua, aire y *organismos vivos*. Existe una creciente conciencia de que el suelo es un componente crítico de la biosfera, no solo por la producción de alimentos, sino también por el mantenimiento de la calidad del ambiente.

Constituye la interface entre tierra, aire y agua albergando la mayor parte de los organismos vivos. Como la formación del suelo es un proceso extremadamente lento en el tiempo debemos considerarlo como un recurso natural no renovable. El suelo nos proporciona comida, biomasa y materias primas además de ser la plataforma de la actividad humana y desempeñar un papel esencial como hábitat y reserva genética. El suelo almacena, filtra y transforma gran cantidad de sustancias incluyendo el agua, los nutrientes y el carbono. Todas estas funciones deben ser protegidas debido a su enorme importancia socio-económica y ambiental. Una condición para erradicar la pobreza y lograr la seguridad alimentaria es realizar un buen manejo del suelo, comprendiendo sus diferentes capacidades y un uso racional tanto para producción vegetal, animal y extracción de recursos que permita la conservación de su biodiversidad.

El uso intensivo de suelo ha traído como consecuencia pérdida de su estructura, disminución de la materia orgánica, y de los microorganismos presentes que al realizar sus procesos metabólicos producen sustancias que contribuyen con la nutrición y la promoción del crecimiento vegetal y mejoran la captación de nutrientes por parte de las plantas. Esa pérdida de biodiversidad, cada vez se evidencia en la baja producción agrícola. Tradicionalmente, para contrarrestar la baja fertilidad de los suelos se emplean fertilizantes químicos; sin embargo, la aplicación de dosis cada vez más altas de fertilizantes se hace insostenible para el agricultor que tiene restricciones de capital y es poco recomendable, debido a la baja captación de los nutrientes por parte de las plantas, debido a que las condiciones del suelo rápidamente capturan los nutrientes dejándolos en formas no disponibles, causando contaminación en los suelos, aguas y aire.

* MSc., Profesor titular, Instituto de Biotecnología, Grupo de Bioprocesos y Bioprospección, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, ncmorenos@unal.edu.co

Dado que la aplicación suficiente y balanceada de materia orgánica y de fertilizantes inorgánicos en el manejo integrado de nutrientes en los diferentes cultivos no se viene haciendo, se ha generado un desequilibrio microbiológico del suelo como resultado de las prácticas de producción tradicionales basadas en nutrición con fuentes químicas exclusivamente, uso excesivo de agroquímicos, bajos o inexistentes aportes de materia orgánica y nula incorporación de microorganismos benéficos. Como consecuencia, los agricultores buscan terrenos nuevos que serán nuevamente contaminados, perdiendo la capacidad del suelo y cada vez en mayor medida, se presenta una reducción en las posibilidades de lotes aptos para la producción.

En específico para asegurar un uso sostenible del recurso suelo en lo relacionado con la agricultura se debe asegurar la rentabilidad del mismo, para el agricultor pero que a su vez sea amigable con el ambiente. Esto se logra haciendo uso de prácticas agronómicas como la rotación de cultivos y preferiblemente la aplicación de bioinsumos, que son microorganismos formulados, de probada actividad y pureza, que le aseguran al agricultor un número específico adecuado por especie, que le dan garantía de calidad y por ende confianza, al menos la misma que le da un producto de origen mineral o químico.

Muchos estudios referencian que en el suelo rizosférico se encuentra una abundante presencia de microorganismos. Hiltner (1904), describió por primera vez el fenómeno de atracción que se observa por parte de los microorganismos hacia los exudados de las raíces, denominando "efecto rizosférico". El observó gran cantidad y actividad de microorganismos en la vecindad de las raíces, desde hace varias décadas se conoce el potencial de las bacterias del suelo para aumentar la productividad.

El principal papel de las bacterias es suministrar nutrientes al cultivo, estimular el crecimiento de las plantas, por ejemplo a través de la producción de fitohormonas y el control o inhibición de actividad de fitopatógenos.

Las bacterias de vida libre o asociativas que habitan la rizosfera pueden estimular el crecimiento de las plantas a través de mecanismos, como: síntesis de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, fijación de nitrógeno, solubilización de nutrientes, producción de sideróforos y control de fitopatógenos del suelo. Muchos microorganismos han sido estudiados, algunos de ellos pertenecen a los géneros *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, and *Rhizobium*; algunos de los cuales sobreviven en condiciones de estrés, lo que les otorga grandes ventajas.

El control biológico, ha sido adoptado como una de las alternativas al uso de productos químicos teniendo en cuenta los beneficios que esta metodología puede aportar a los sistemas productivos agrícolas al usar como principio activo microorganismos antagonistas de fitopatógenos. El uso de agentes microbianos antagonistas que se establecen bien sea en la rizósfera, la endosfera o la filósfera de las plantas de interés generan un efecto protector en la misma frente a diversos patógenos, siendo en la mayoría de los casos capaces de crecer de manera auto sostenible después de una inoculación inicial, lo cual les permite generar un efecto de supresión de patógenos a mediano o largo plazo en el cultivo con un impacto ambiental menor al que el control químico tradicional genera. Para la generación de este efecto, los agentes biocontroladores pueden hacer uso de uno o más mecanismos que incluyen competencia por nutrientes, exclusión de nichos (competencia por espacio), interferencia de señales tipo Quorum sensing (Quorum quenching), parasitismo, producción de metabolitos secundarios difusibles o volátiles con actividad antimicrobiana e inducción de resistencia sistémica en plantas (Vinchira *et al*, en publicación)

La tecnología de producción que era un problema antes, hoy día está resuelta por completo con equipos que aseguran 100 % de asepsia, buen control y medición de variables de proceso, bien diseñados y construidos con altos estándares de precisión, tanto en fermentación en estado sólido como fermentación en cultivo sumergido. La fermentación en estado sólido es muy utilizada para la producción de hongos ya que es la forma similar como se producen en la naturaleza, mientras que para cultivos bacterianos, la fermentación en cultivo sumergido es ampliamente utilizada. Para aumentar el rendimiento y la actividad del microorganismo es necesario optimizar la composición del medio de cultivo, las condiciones de la fermentación y todos los parámetros del proceso, igual que se realiza en cualquier otro proceso de producción.

En Colombia, el campo y los campesinos han sido los más afectados por el conflicto armado, los procesos de paz abren una oportunidad para revitalizarlos. Adicionalmente, la ausencia de tecnología en manos de nuestros campesinos ha hecho que el campo Colombiano no explote todo su potencial. La oportunidad del postconflicto, requiere de muchos esfuerzos y viene acompañada de muchas necesidades, la recuperación de suelos y la mejora en la productividad de los cultivos es posible si se planea con criterios de sostenibilidad, que involucren soluciones microbiológicas, con nuevos productos de impacto negativo menor o nulo sobre el ambiente. El daño que le hacemos al planeta y a nuestra propia salud con el uso intensivo y desmedido de los productos químicos es grave e irreversible. Nuestra propuesta es hacer uso de productos biológicos, reemplazando parcialmente los químicos a las cantidades mínimas necesarias, evitando su acumulación en los suelos, aguas, aire y principalmente en los productos que consumimos. Esto les abre mercados a nuestros campesinos a nivel internacional y nacional que cada vez mas somos conscientes de la necesidad de un consumo más sano.

Hoy día se cuenta con tecnología que le brinda la confianza al agricultor, lo que anteriormente se consideraban retos inalcanzables hoy en día son una realidad. Tenemos productos microbiológicos que son seguros para el agricultor, que le incrementan el rendimiento y son seguros para el ambiente. Lo más importante protegen a las plantas de los químicos que son usados para combatir plagas y enfermedades pero más que cumplir con la protección que ofrecen tienen un impacto peligroso sobre el ecosistema.

Los suelos se han descuidado durante demasiado tiempo. No somos capaces de conectar suelo con nuestra comida, el agua, el clima, la biodiversidad y la vida. Hay que invertir esta tendencia y tomar algunas acciones: preservación y restauración!!

Asociaciones de marcadores moleculares con la resistencia a enfermedades, caracteres morfológicos y agronómicos en familias diploides de papa (*Solanum tuberosum* L.)

Associations of molecular markers with diseases resistance, morphological and agronomic characters in potato diploid families (*Solanum tuberosum* L.)

Julio Gabriel^{*}, Silene Veramendi^{**}, Linett Pinto^{***}, Leslie Pariente^{***},
Ada Angulo^{**}

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57712

Resumen

Quince familias de papa (824 genotipos) provenientes de cruzas inter-específicas entre especies de *Solanum stenotomum*, *S. goniocalyx* y *S. phureja* fueron genotipadas, con el objetivo de asociar seis marcadores moleculares (GP94, HC, NL25, Gro 1-4, RYSC3 y CP60) con genes mayores de resistencia para tizón tardío (*Phytophthora infestans*), verruga (*Synchytrium endobioticum*), nematodo - quiste (*Globodera pallida* y *G. rostochiensis*) y virus PVY y PVX. Los resultados mostraron que cinco de los marcadores aplicados fueron polimórficos y amplificaron en más del 80% de las familias. El marcador RYSC3 que co-localiza con el gen Ry_{adg} no amplificó en ninguna de las familias evaluadas. La familia 8 amplificó la banda para tres marcadores (CP60, GP94 y NL25) en la totalidad de sus clones. La prueba de χ^2 se utilizó para determinar el ajuste de las proporciones de segregación de cada familia para cada marcador y genotipar los progenitores. Nueve caracteres agronómicos y morfológicos fueron evaluados en la cosecha. Mediante agrupamiento cluster fueron seleccionados 107 clones con resistencia a PVX, *P. infestans*, *G. rostochiensis* y *S. endobioticum*, alto rendimiento y volumen de tubérculos, elevado número de tubérculos y ojos superficiales. Sobre la base de estos resultados, aspectos prácticos para la aplicación eficiente de la selección asistida por marcadores moleculares son discutidos en este artículo.

Palabras clave: Tizón, verruga, virus, nematodos, polimórficos, genes mayores.

Abstract

Fifteen families of potato (824 genotypes) originated from inter-specific crosses among *Solanum stenotomum*, *S. goniocalyx* and *S. phureja* were genotyped in order to associate six molecular markers (GP94, HC, NL25, Gro 1-4, RYSC3 and CP60). These molecular markers are linked to major genes for resistance to late blight (*Phytophthora infestans*), wart (*Synchytrium endobioticum*), root cyst nematode (*Globodera pallida* and *G. rostochiensis*) and viruses PVY and PVX. Results showed that five of six molecular markers were polymorphic and primers amplified in more than 80 % of the families. Molecular marker RYSC3 that is linked to Ry_{adg} gene did not amplify in any family. All individuals in Family 8 scored positive for three markers (CP60, GP94, and NL25). χ^2 test was used to determine the significance of the segregation ratios of each marker in every single family; so to the possible genotype of its parents was inferred. Nine morphological and agronomical characters were assessed during the harvest. Cluster analysis classified and selected 107 genotypes by putative resistance to PVX, *P. infestans*, *G. rostochiensis* and *S. endobioticum*, high yield, tuber volume and tuber number and shallow eyes. According to our results, practical aspects of efficient use of marker assisted selection in potato are discussed in this paper.

Key words: Late blight, wart, virus, nematodes, polymorphic, major genes.

Recibido: abril 10 de 2015

Aprobado: abril 13 de 2016

* Investigador PhD. Fundación PROINPA, Casilla 4285, Cochabamba, Bolivia. j.gabriel@proinpa.org

** Investigadoras M.Sc. Fundación PROINPA, Casilla 4285, Cochabamba, Bolivia.

*** Investigadoras. Facultad de Bioquímica, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia.

Introducción

Las plagas y enfermedades son los principales problemas para el cultivo de papa en todo el mundo, sobre todo en las parcelas de los agricultores de escasos recursos en los países menos desarrollados, donde la certificación de cultivos y la protección química no son generalmente accesibles, y también en la agricultura orgánica en los países industrializados (Gebhardt *et al.*, 2006). Se estima que las plagas y enfermedades del cultivo de papa causan 30 % de pérdidas antes de la cosecha y 20 % en poscosecha en los países en desarrollo en comparación con 5 y 10 % en países desarrollados (FAO, 2010).

El mejoramiento convencional para resistencia a plagas y enfermedades consiste en la identificación de fuentes de resistencia, que a menudo se encuentran en las especies emparentadas y silvestres de papa. La introgresión de los genes de resistencia de éstas especies por retrocruzamiento recurrente a diferentes clones de *Solanum tuberosum* L., generó en los últimos 50 años muchos genotipos y clones resistentes (Ross, 1986).

En las últimas dos décadas, varios de estos genes de resistencia se han localizado en el mapa genético de la papa utilizando marcadores moleculares. Se han identificado genes mayores (genes R), así como loci de resistencia cuantitativa (QTR) (Gebhardt y Valkonen, 2001). El conocimiento de la posición de los genes de resistencia en el mapa genético; así como, la existencia de marcadores moleculares estrechamente ligados a dichos genes facilita ahora la localización y combinación de factores de resistencia de diferentes fuentes (Gebhardt *et al.*, 2006).

Al momento, ya se han integrado caracteres cualitativos en los mapas genéticos de la papa (Ritter *et al.*, 2005), como la resistencia monogénica a PVY (*Ry_{sto}*, Brigneti *et al.*, 1997, *Ry_{adg}*, Hämäläinen *et al.*, 1997), a PVX (*Rx1*, *Rx2*, Ritter *et al.*, 1991; *Nb*, De Jong *et al.*, 1997, *Nx_p*, Tommiska *et al.*, 1998), a los nematodos (*Gro1*, Barone *et al.*, 1990, *H1*, Gebhardt *et al.*, 1993, *Gpa1*, Kreike *et al.*, 1996, *Gpa2*, Rouppe van der Voort *et al.*, 1997, *Gpa5*, Rouppe van der Voor *et al.*, 2000) y al tizón tardío (*R1*, Leonards-Schippers *et al.*, 1994, *R3*, El-Kharbotly *et al.*, 1994, *R2*, Li *et al.*, 1998, *R6* y *R7*, El-Kharbotly *et al.*, 1996). Asimismo, también se han integrado caracteres cuantitativos como la resistencia poligénica a tizón (*Rpi-phu1*, Sliwka *et al.*, 2010) y nematodo-quiste (*RGp5-vrnHC*, Sattarzadeh *et al.*, 2006).

El virus de la papa PVY (género Potyvirus) es uno de los patógenos virales más importantes de la papa cultivada. Se identificó un solo gen dominante de resistencia extrema (RE) *Ry_{adg}* a PVY en *S. andigena* (Muñoz *et al.*, 1975), que se encuentra en el cromosoma XI (Hämäläinen *et al.*, 1997). El gen *Ry_{adg}* está estrechamente vinculado a una familia de genes con una alta homología de secuencia con el gen N del tabaco que confiere resistencia al virus del mosaico del tabaco

(Leister *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 2002). El gen N es el prototipo de los genes de resistencia de la familia de las solanáceas que tienen en común los dominios proteicos: sitio de unión al nucleótido (NB) y repeticiones ricas en leucina (LRR) (Whitham *et al.*, 1994; Leister *et al.*, 1996; Hämäläinen *et al.*, 1997; Hehl *et al.*, 1999; Vidal *et al.*, 2002). El marcador SCAR RYSC3 se obtuvo en base a polimorfismos localizados en secuencias similares al gen de resistencia (RGL). Estas RGL están ligadas al locus *Ry_{adg}* (Sorri *et al.*, 1999; Kasai *et al.*, 2000). RYSC3 también funciona como un marcador para el gen *Na_{adg}* que está estrechamente ligado a *Ry_{adg}* (en el mismo grupo de genes) (Hämäläinen *et al.*, 1997). *Na_{adg}* confiere resistencia hipersensitiva al virus A de la papa.

El nematodo-quiste de la raíz de la papa es una de las enfermedades del suelo más importante en muchos países del mundo. Existen dos especies de nematodos: *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida*. Lamentablemente ni la rotación de cultivos ni el control químico tienen un efecto significativo sobre el desarrollo de la enfermedad. Por tanto, el cultivo de variedades resistentes y la incorporación de genes de resistencia en variedades comerciales es la mejor opción para el control de nematodos (Asano *et al.*, 2012). Muchos factores de resistencia provenientes de *S. andigena*, *S. vernei* y *S. spgazzinii* se introdujeron en el pasado dentro de clones y variedades (Ross, 1986). El gen dominante *Gro1* da resistencia a todos los patotipos conocidos de *G. rostochiensis*, probablemente se originó a partir de *S. spgazzinii* y fue localizado en el cromosoma VII de papa (Barone *et al.*, 1990). *Gro1* es probablemente idéntico al gen *Fb* descrito por primera vez por Ross (1962). A nivel molecular, el locus *Gro1* consiste en una familia con grupos de genes del tipo NB-LRR. Uno de los miembros de esta familia, *Gro1-4*, demostró que confiere resistencia a *G. rostochiensis* patotipo Ro1 (Paal *et al.*, 2004). El marcador molecular *Gro1-4* puede detectar al gen *Gro1-4* (Biryukova *et al.*, 2008, Gebhardt *et al.*, 2006). El marcador HC detecta al gen *RGp5-vrnHC*, el cual confiere resistencia parcial a *G. pallida* patotipo Pa2/3 (Sattarzadeh *et al.*, 2006). HC es un SNP (Single-nucleotide polymorphism) y el marcador más utilizado para diagnosticar resistencia a *G. pallida*. El origen del alelo *RGp5-vrnHC* fue *S. vernei*.

Genes mayores de resistencia extrema (RE) para el virus X de la papa (PVX, género Potexvirus) fueron identificados en clones diploides. El gen dominante *Rx1* fue mapeado en el cromosoma XII de la papa (Ritter *et al.*, 1991). El origen de *Rx1* no está claro. RE a PVX se ha introducido de *S. andigena* y *S. acaule* (Ross, 1986). Lo más probable es que *Rx1* corresponda al gen *Ry_{adg}* de *S. andigena* (Ritter *et al.*, 1991). El marcador CAPS CP60 es utilizado para detectar al gen *Rx1* (Bendahmane *et al.*, 1997).

La resistencia a verruga (*Synchytrium endobioticum*) está gobernada por genes R mayores, por lo que se

trata de un tipo de resistencia monogénica. Este carácter está gobernado por un gen dominante y fue detectado en el cromosoma XI en una posición similar al gen *Ry_{adg}* (Hehl *et al.*, 1999) y el gen *Sen1* está ligado a genes homólogos N.

La herencia de la resistencia a tizón (*Phytophthora infestans*) es compleja y es gobernada por muchos genes (carácter poligénico), tal como lo indicaron Wastie (1991) y Ross (1996). Ritter *et al.* (2009) y Gabriel *et al.* (2011) encontraron resistencia parcial al tizón conferida por genes menores en cruza realizadas entre especies silvestres como *S. okadae*, *S. canacense*, *S. bukasovii*, *S. jamezii* y *S. raphanifolium* con especies cultivadas de *S. phureja* y *S. goniocalyx*. Sin embargo, estudios realizados por Colon *et al.* (1995) observaron resistencia parcial conferida por genes R provenientes de especies silvestres como *S. arnezii*, *S. holdelmanni*, *S. leptophyes*, *S. berthaultii* y *S. microdontum*. Por otra parte, Sliwka *et al.* (2010) desarrollaron el marcador GP94 para detectar el gen de resistencia a tizón *Rpi-phu1* de *S. phureja*, que está ubicado en el cromosoma IX del genoma de papa. Este gen se origina de un híbrido interespecífico entre *S. stenotomum* y *S. phureja*, y confiere un elevado nivel de resistencia a *P. infestans*.

Gebhardt *et al.* (2006), aplicaron marcadores moleculares para seleccionar plantas que combinen el gen *Ry_{adgr}*, que confiere resistencia extrema a PVY, el gen *Gro1* para resistencia al nematodo *G. rostochiensis*, el gen *Rx1* para resistencia extrema al PVX y el gen *Sen1* para resistencia a verruga. Los clones resultantes mostraron resistencia a uno o más de los patógenos mencionados.

En este estudio se describe la implementación de la selección asistida por marcadores (SAM) con el objeto de asociar marcadores moleculares con los genes de resistencia para tizón tardío (*P. infestans*), verruga (*S. endobioticum*), nematodo - quiste (*G. pallida* y *G. rostochiensis*) y virus PVY y PVX en 15 familias diploides de papa del tercer ciclo de selección recurrente del programa de biofortificación para alta concentración de Fe y Zn, generadas por el programa de mejoramiento genético del Centro Internacional de la Papa (CIP), de los cuales no se cuenta con los antecedentes de resistencias a patógenos.

Materiales y métodos

Material biológico

En invernadero fueron sembradas, 15 familias de papa diploide (824 genotipos) del tercer ciclo de selección recurrente para incrementar las concentraciones de Fe y Zn (tabla 1), obtenidas en el Programa de Mejoramiento Genético de Papa del CIP en Lima, Perú. Estas familias provienen de la cruce interespecífica entre especies nativas de *Solanum stenotomum*, *S. goniocalyx* y *S. phureja*. Antes de la siembra se sumergió la semi-

lla sexual en una solución de ácido giberélico a 1500 ppm, disolviendo 0.75 g x 0.5 litro de agua destilada esterilizada, por 24 horas, para romper la dormancia y uniformizar la germinación.

Luego de secar la semilla bajo condiciones de ambiente, fueron sembradas 100 semillas/familia, en bandejas de almácigo utilizando un sustrato esterilizado de musgo, arena y tierra en una proporción 2:1:1. Los almácigos se regaron tres veces al día. Al mes de la siembra, las plantas fueron trasplantadas a macetas de 500 g de capacidad en sustrato esterilizado para su crecimiento.

Se utilizaron como controles positivos en la reacción PCR a las variedades Isabel y P'alta Chola, y un control negativo de reacción en base a agua destilada (Vera-mendi *et al.*, 2011).

Condiciones del experimento

El experimento se implementó en un invernadero y los análisis moleculares se realizaron en el laboratorio de Biología Molecular y Bioinformática de la Fundación PROINPA, ubicada a 13 km en la zona de El Paso de la provincia Quillacollo en Cochabamba, a 17° 21' 01.91" de Latitud Sud y 66° 15' 44.34" de Longitud Oeste, a una altura de 2613 msnm, una precipitación media anual de 512 mm y una temperatura promedio de 17.4 °C.

Extracción de ADN

En invernadero se colectaron folíolos tiernos y sanos de cada planta de las 15 poblaciones de papa, debidamente identificadas y refrigeradas a -20 °C, que fueron molidas en nitrógeno líquido (-195 °C). De este molido, se utilizaron 100 mg para el proceso de extracción de ADN genómico mediante el protocolo de CTAB 2X (hexadecil bromuro de trimetil amonio) (Doyle y Doyle, 1990).

Cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación de ADN genómico se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %. Las muestras se migraron durante 45 min en cubetas de electroforesis a una potencia de 70 V (5v/cm) y fueron visualizadas a través de un transluminador UV marca Biorad.

La calidad y concentración del ADN genómico extraído se verificaron por comparación de intensidad de las bandas de las muestras con cada una de las bandas del marcador de peso molecular de concentración conocida (10000 bp Eurogentec).

Análisis de marcadores

Se utilizaron seis diferentes marcadores que están ligados y co-localizados con genes de resistencia para *P.*

Tabla 1. Código, genealogía, número de clones y origen de 15 familias de papa utilizadas para SAM. El Paso, 2013.

Familia	Código	Genealogía	No. de clones
1	311022	MN-5.58XMN-1.78	48
2	311024	MN-5.58XMN-13.62	75
3	311035	MN-5.58XMN-3.68	20
4	311028	MN-5.58XMN-15.55	57
5	311047	MN-13.62XMN-1.78	54
6	311080	MN-3.68XMN-13.62	73
7	311081	MN-3.68XMN-13.65	53
8	311083	MN-3.68XMN-7.53	34
9	311085	MN-3.68XMN-15.55	43
10	311100	MN-15.55XMN-13.65	81
11	311102	MN-15.55XMN-3.68	67
12	311200	703294XMN-2.106	39
13	311209	703294XMN-7.53	47
14	311340	703597XMN-15.55	66
15	311423	704120XMN-15.55	67
Total			824

Leyendas: 311022=[(stn-stn)x(stn-gon)]x[(stn-stn)x(stn-gon)]; 311024=[(stn-stn)x(stn-gon)]x[(stn-stn)x(stn-gon)]; 311035=[(stn-stn)x(stn-gon)]xphu; 311028=[(stn-stn)x(stn-gon)]x[(stn-stn)x(gon-stn)]; 311047=[(stn-stn)x(stn-gon)]x[(stn-stn)x(stn-gon)]; 311080=[(stn-stn)x(gon-stn)]x[(stn-stn)x(stn-gon)]; 311081=[(stn-stn)x(gon-stn)]x[(stn-stn)x(stn-gon)]; 311083=[(stn-stn)x(gon-stn)]x[(stn-stn)x(gon-stn)]; 311085=[(stn-stn)x(gon-stn)]x[(stn-stn)x(gon-stn)]; 311100=[(stn-stn)x(gon-stn)]x[(stn-stn)x(stn-gon)]; 311102=[(stn-stn)x(gon-stn)]x[(stn-stn)x(gon-stn)]; 311200=phux[(stn-stn)x(gon-gon)]; 311209=phux[(stn-stn)x(gon-gon)]; 311340=phux[(stn-stn)x(gon-gon)]; 311423=phux[(stn-stn)x(gon-gon)].

infestans, *G. pallida*, *G. rostochiensis*, *S. endobioticum*, PVX y PVY en un mapa referencial de papa (Ritter *et al.*, 2005; 2008; 2009). En la tabla 2 se describen los genes de resistencia a tizón (*P. infestans*), nemátodo-quiste (*Globodera rostochiensis*, *G. pallida*), PVY, PVX, verruga (*Synchytrium endobioticum*) y marcadores flanqueantes (MF) para cada gen/QTL, recopilados en los 12 cromosomas de la papa. La tabla 3 muestra la

secuencia de los cebadores utilizados para amplificar los correspondientes marcadores para el cribado de los genes de resistencia.

Condiciones de la PCR

Se determinó la temperatura de hibridación específica para cada marcador, realizando una PCR Hot Start en

Tabla 2. Cromosoma, marcador flanqueante, factor de resistencia y referencia para seis genes mayores de resistencia recopilados en los 12 cromosomas de la papa.

Nº	Crom	Gen	MF	Factor	Referencia
1	XI	Ryadg	RYSC3	PVY	Gebhardt <i>et al.</i> , (2006)
2	V	RGp5-vrnHC	HC	G. p.	Sattarzadeh <i>et al.</i> , (2006)
3	VII	Gro 1-4	Gro1-4	G. r.	Gebhardt <i>et al.</i> , (2006)
4	IX	Rpi-phu 1	GP94	P.i.	Sliwka <i>et al.</i> , (2010)
5	XI	Sen1	NL25	S.e.	Bormann (2004)
6	XII	Rx1	CP60	PVX	Bendahmane <i>et al.</i> , (1997)

Leyendas: MF=Intervalos de marcadores flanqueantes para cada QTL/gen. P.i.=*Phytophthora infestans*, G.r.=*Globodera rostochiensis*, G.p.=*G. pallida*, S.e.=*Synchytrium endobioticum*.

Tabla 3. Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar los correspondientes marcadores para el cribado de QTL/genes conocidos en 15 familias diploides de papa.

Marcador	Cebador	T° A (°C)	Tamaño (bp)	Protocolo
HC	D: ACACCACCTGTTTGATAAAAAACT R: GCCTTACTTCCCTGCTGAAG	58	276	PCR
Gro1-4	D: TCTTTGGAGATACTGATTCTCA R: CGACCTAAAATGAAAAGCATCT	60	602	PCR
GP 94	D: ATGTATCACAATCACATTCTTGCTC R: TGTA AAAACCAACAAGTAGTGTTC	56	350	PCR
NL-25	D: TAT TGT TAA TCG TTA CTC CCT C R: AGA GTC GTT TTA CCG ACT CC	58	1000	CAPS
RYSC3	D: ATA CAC TCA TCT AAA TTT GAT GG R: AGG ATA TAC GGC ATC ATT TTT CCG A	58	320	SCAR
CP60	D: CAGCCTACCGCGAAAGTGCCTTCG R: GCCAACCCACGAGTTTCTCACTGAC	56	350	CAPS

Leyendas: D: Cebador directo, R: Cebador reverso, T°A: Temperatura de anillamiento, bp: Pares de bases, PCR: Polimeraza Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa), SCAR: Sequence Characterized Amplified Region (Secuencia caracterizada de la región de amplificada); CAPS: Cleaved Amplified Polymorphic Sequency (Secuencia polimórfica amplificada y cortada).

gradiente en la que se seleccionó la banda para cada caso (tabla 4).

Se utilizaron 15 µL de mezcla con 15 ng de ADN Molde, 1X de Tampón PCR 10X, 0,2 mM dNTP, 1 pmol/µL de cada iniciador y 0,025 U/µL de la enzima Taq Polimerasa. El programa de amplificación fue realizado en un termociclador (modelo PTC-100, MJ Research, Ramsey, Minnesota, USA), que consistió en un tiempo de desnaturalización inicial de 5 min del ADN a 94 °C, 35 ciclos a 94 °C por 1 min, temperatura de anillamiento en °C por 45 seg, y extensión a 72 °C por 2 min, más una extensión final de 7 min, según el marcador. Luego, los productos de amplificación fueron resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,8 %, aplicando una corriente de 5 V/cm. Los geles se visualizaron en un transluminador marca Biorad.

Análisis de alelos

Las huellas genéticas generadas por hibridación o por PCR, son heredadas a la descendencia de acuerdo a las leyes mendelianas (Valdez-Moctezuma y Kahl, 2005). Los geles fueron analizados de forma visual, utilizando una matriz de presencia-ausencia del fragmento amplificado para el QTA-genotyping (Gabriel, 2008). Los datos de presencia o ausencia para cada marcador segregante en cada progenie, se almacenaron en archivos con formato Excel para su posterior análisis estadístico. Se utilizó la prueba de χ^2 para determinar la significancia de la desviación para los dos tipos de segregación esperada (3:1 y 1:1) cuando se tiene un marcador dominante en un diploide.

Este análisis sirvió; asimismo, para identificar aquellas poblaciones que presentaron las bandas de los marcadores (que indicarían resistencia en caso de validar los marcadores en las poblaciones caracterizadas en este trabajo) en la totalidad de sus genotipos para la mayoría de las enfermedades (falta de segregación). Estas poblaciones serán buenas fuentes de resistencia conjunta a varias enfermedades.

Caracterización morfológica y agronómica

Al momento de la cosecha se caracterizó cada genotipo con los descriptores mínimos recomendados por el INIA (INIA, 2009), considerando las variables morfológicas (uniformidad, tamaño, color de piel, color de pulpa, profundidad de ojos y forma de tubérculos) y agronómicas (número, peso y volumen de los tubérculos).

Para el análisis de integración entre los caracteres morfológicos, agronómicos y moleculares se realizó un análisis de agrupamiento clúster utilizando el algoritmo de Ward en el SPSS.15 (SPSS, 2012), lo que permitió seleccionar el grupo con mejores características.

Análisis de correlación

Para determinar si existe asociación entre la resistencia a estas cinco enfermedades y los caracteres morfológicos y agronómicos deseables. Previo al análisis de correlación se realizaron pruebas de normalidad y la homogeneidad de varianzas. Los caracteres morfológicos, agronómicos y moleculares posteriormente

Tabla 4. Determinación del patrón de segregación esperada para seis marcadores aplicados en 15 familias híbridas de papa.

Marcador/Patógeno	Familia	Mejor modelo	Cromosoma	Prob X ² 3:1	Prob X ² 1:1
HC/G.p.	Fam1	3:1	V	1,78ns	
	Fam2	1:1	V	21,16**	0,12ns
	Fam3	?	V	26,67**	5,00*
	Fam4	3:1	V	1,69ns	24,02**
	Fam5	3:1	V	2,99ns	4,74*
	Fam6	Todas resistentes	V	24,33**	73,00**
	Fam7	1:1	V	24,96**	0,47ns
	Fam8	?	V	65,92**	16,94**
	Fam9	3:1	V	2,24ns	3,93*
	Fam10	3:1	V	1,49ns	11,86**
	Fam11	1:1	V	10,07**	1,80ns
	Fam12	3:1	V	6,23ns	27,92**
	Fam13	1:1	V	23,04**	0,53ns
	Fam14	3:1	V	0,18ns	19,64**
	Fam15	?	V	7,57**	41,93**
Gro1-4/G.r.	Fam1	?	VII	9,00**	36,75**
	Fam2	3:1	VII	0,04ns	20,28**
	Fam3	1:1	VII	6,67*	0ns
	Fam4	3:1	VII	0,01ns	14,75**
	Fam5	3:1	VII	0,62ns	18,96**
	Fam6	?	VII	9,25**	47,68**
	Fam7	1:1	VII	21,89**	0,17ns
	Fam8	?	VII	53,69**	11,76**
	Fam9	1:1	VII	25,19**	1,14ns
	Fam10	No amplifico			
	Fam11	?	VII	43,03**	2,52*
	Fam12	1:1	VII	14,37**	0,03ns
	Fam13	1:1	VII	17,03**	0,02ns
	Fam14	No amplifico			
	Fam15	No amplifico			
CP60/ PVX	Fam1	?	XII	13,44**	44,08**
	Fam2	?	XII	11,56**	52,92**
	Fam3	3:1	XII	0,27ns	7,2**
	Fam4	3:1	XII	0,29ns	10,96**
	Fam5	3:1	XII	0,62ns	18,96**
	Fam6	?	XII	12,83**	54,37**
	Fam7	?	XII	12,74**	45,30**
	Fam8	Todas resistentes	XII	11,33**	34,00**
	Fam9	3:1	XII	5,65ns	28,49**
	Fam10	3:1	XII	0,50ns	15,12**
	Fam11	?	XII	10,99**	48,49**
	Fam12	3:1	XII	0,08ns	11,31**
	Fam13	3:1	XII	5,17ns	29,13**
	Fam14	?	XII	7,29**	40,97**
	Fam15	3:1	XII	2,63ns	30,22**

Marcador/Patógeno	Familia	Mejor modelo	Cromosoma	Prob χ^2 3:1	Prob χ^2 1:1
GP94/P.i.	Fam1	Todas resistentes	IX	16,00**	48,00**
	Fam2	?	IX	17,64**	63,48**
	Fam3	Todas resistentes	IX	6,67*	20,00**
	Fam4	?	IX	14,04**	49,28**
	Fam5	Todas resistentes	IX	18,00**	54,00**
	Fam6	Todas resistentes	IX	24,33**	73,00**
	Fam7	?	IX	15,10**	49,08**
	Fam8	Todas resistentes	IX	11,33**	34,00**
	Fam9	Todas resistentes	IX	14,33**	43,00**
	Fam10	?	IX	21,93**	73,20**
	Fam11	?	IX	10,99**	48,49**
	Fam12	Todas resistentes	IX	13,00**	39,00**
	Fam13	3:1	IX	5,17ns	29,13**
	Fam14	?	IX	16,99**	58,24**
	Fam15	?	IX	19,75**	63,06**
NL25/S.e.	Fam1	?	XI	9,00**	36,75**
	Fam2	?	XI	17,64**	63,48**
	Fam3	Todas resistentes	XI	6,67*	20,00**
	Fam4	?	XI	11,84**	45,63**
	Fam5	3:1	XI	2,00ns	6,00*
	Fam6	?	XI	10,96**	50,97**
	Fam7	?	XI	6,85*	34,89**
	Fam8	Todas resistentes	XI	11,33**	34,00**
	Fam9	3:1	XI	1,74ns	19,56**
	Fam10	3:1	XI	3,00ns	9,00**
	Fam11	3:1	XI	1,80ns	27,60**
	Fam12	3:1	XI	3,09ns	21,56**
	Fam13	3:1	XI	3,75ns	26,06**
	Fam14	?	XI	16,99**	58,24**
	Fam15	?	XI	9,20**	45,15**

Leyendas: ?=Desconocido, Crom=Cromosoma, G.p.=*G. pallida*, G.r.=*G. rostochiensis*, P.i.=*P. infestans*, S.e.=*S. endobioticum*.

fueron correlacionados mediante los algoritmos de Pearson y Spearman (SAS, 2004).

Resultados

Mediante el protocolo utilizado para la extracción de ADN genómico se obtuvo ADN en una concentración que fluctuó de 40 ng/ μ L a 100 ng/ μ L de buena calidad.

Análisis de alelos

Con un patrón de segregación de alelos de ab, bb=1 para presencia de banda, aa=0 para ausencia de banda y ?=patrón de bandas desconocidas (tabla 4), se determinaron los porcentajes en cada familia para los dos tipos esperados de segregación. Asimismo, se determinaron los posibles genotipos de los progenitores

para cada tipo de segregación: aa x ab (50 % resistente y 50 % susceptible) y ab x ab (75 % resistente y 25 % susceptible). También se determinaron los genotipos de los progenitores en caso de no segregación: aa x aa (Toda la progenie susceptible) y aa x bb, ab x bb o bb x bb (Toda la progenie resistente). Se debe mencionar que en nuestro trabajo no se hizo un análisis fenotípico de reacción a los patógenos.

Resistencia a *Globodera* sp.

El marcador HC que co-localiza con el gen *RGp5-vmHV* de resistencia a *G. pallida*, amplificó una banda de 276 bp (figura 1A). El análisis de χ^2 de ajuste de frecuencia para la segregación del marcador HC que co-segrega junto al gen mayor *RGp5-vmHV* (tabla 4), mostró que un 46,7 % de las familias (Fam 1, Fam 4,

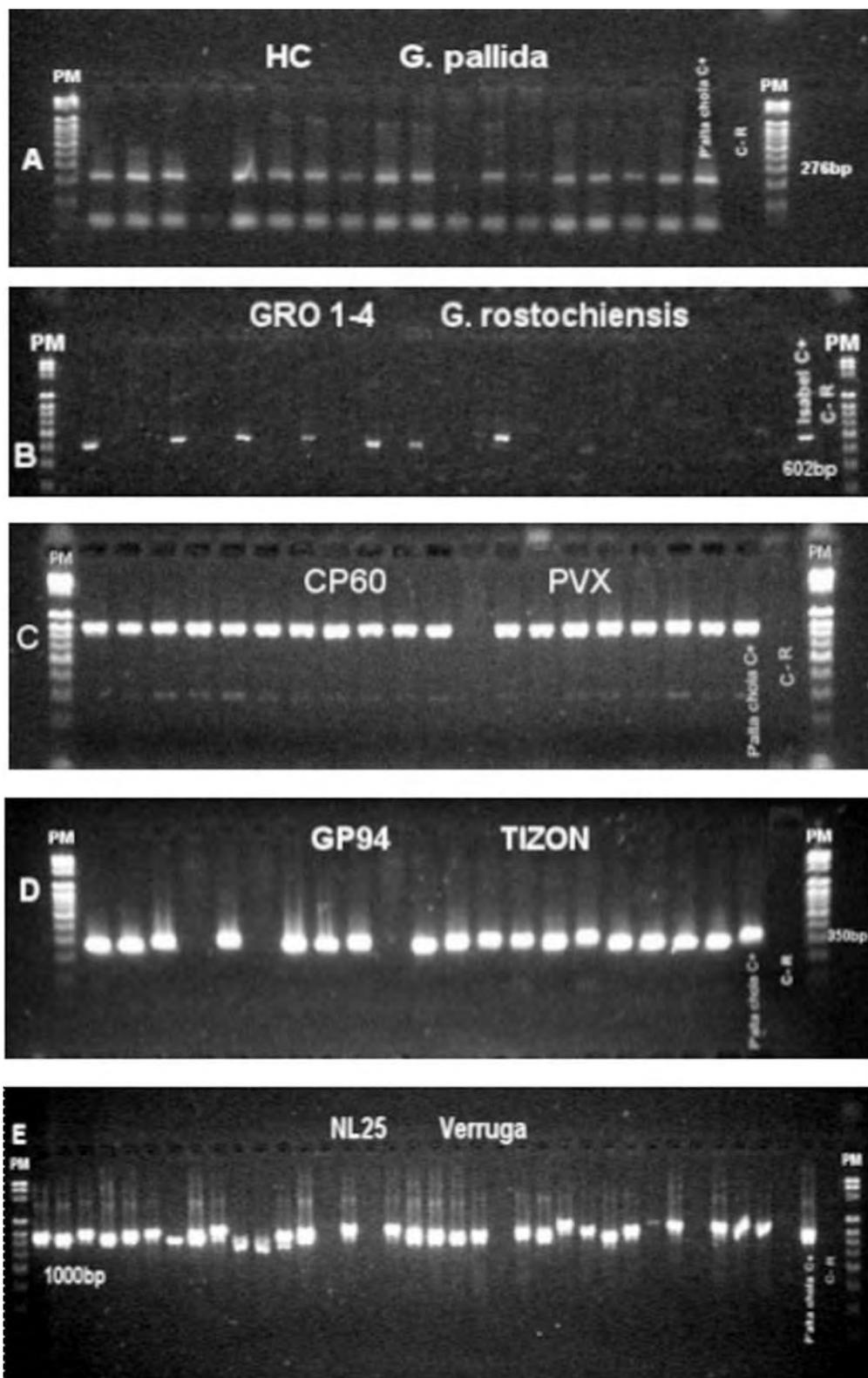


Figura 1. Amplificación de ADN para los diferentes marcadores utilizados: (A) Marcado HC co-localizado con el gen R-cRGp5-vrn para *G. pallida*; (B) Marcador Gro1-4 co-localizado con el gen R-Gro1-4 para *G. rostochiensis*.; (C) Marcador CP60 co-localizado con el gen Rx1 de resistencia al virus PVX; (D) Marceado GP 94 co-localizado con el gen R-Rpi-phu 1 para *P. infestans* y (E) Marcador NL25 co-localizado con el gen R-Sen1 para *S. endobioticum*.

Fam 5, Fam 9, Fam 10, Fam 12 y Fam 14) se ajustaron a la proporción 3:1 y el genotipo de ambos padres sería ab, 26,7% de las familias (Fam 2, Fam 7, Fam 11 y Fam 13) se ajustaron a la proporción 1:1 y los genotipos de los progenitores serían aa y ab, 20 % de las familias (Fam 3, Fam 8 y Fam 15) no se ajustaron a ninguna proporción esperada y un 6,7 % (Fam 6) no segregó para este marcador (tabla 4) siendo los posibles genotipos de los progenitores aa y bb, ab y bb o bb y bb. La familia 6 sería una excelente fuente de resistencia para *G. pallida* al presentar la totalidad de su progenie (73 clones) la presencia del marcador y; por tanto, presentarían a su vez el gen de resistencia de amplio espectro a *RCp5-vmHV*.

El marcador Gro1-4 que co-localiza con el gen mayor *Gro1-4* de resistencia a *G. rostochiensis* amplificó una banda de 602 bp (figura 1B) en solamente doce de las 15 familias. En las restantes tres familias no hubo amplificación (todas susceptibles) y; por tanto, el genotipo de ambos progenitores sería aa. El análisis de χ^2 de ajuste de frecuencia para la segregación del marcador Gro1-4 que está ligado al gen mayor *Gro1-4* (tabla 4), mostró que un 25% de las familias (Fam 2, Fam 4, Fam 5) se ajustaron a la proporción esperada 3:1 y el genotipo de ambos padres sería ab, un 50% (Fam 3, Fam 7, Fam 9, Fam 11, Fam 12 y Fam 13) se ajustaron a la proporción 1:1 y los genotipos de los progenitores serían aa y ab. Por otra parte, el 25% de las familias (Fam 1, Fam 6 y Fam 8) no se ajustaron a ninguna proporción esperada.

Resistencia a PVX

El marcador CP60 que co-localiza con el gen *Rx1* de resistencia al virus PVX, amplificó una banda de 1000 bp (figura 1C). El análisis de χ^2 de ajuste de frecuencia para la segregación del marcador CP60 ligado al gen mayor *Rx1* (tabla 4), mostró que un 53,3 % de las familias (Fam 3, Fam 4, Fam 5, Fam 9, Fam 10, Fam 12, Fam 13, Fam 15) se ajustaron a la proporción esperada de alelos 3:1 y el genotipo de ambos padres sería ab, un 40 % (Fam 1, Fam 2, Fam 6, Fam 7, Fam 11, Fam 14) no se ajustaron a la proporción esperada y un 6,7 % (Fam 8) no segregó para este marcador, siendo los posibles genotipos de los progenitores aa y bb, ab y bb o bb y bb. La Fam 8 sería una excelente fuente de resistencia para PVX al presentar la totalidad de su progenie (34 genotipos) la presencia del marcador y por tanto presentarían a su vez el gen de extrema resistencia a PVX.

Resistencia a *S. endobioticum*

El marcador NI25 que co-localiza con el gen *Sen1* de resistencia a *S. endobioticum*, amplificó una banda de 1000 bp (figura 1D). El análisis de χ^2 de ajuste de frecuencia para la segregación del marcador NI25 ligado al gen mayor *Sen1* (tabla 4), mostró que un 40 % de las familias (Fam 5, Fam 9, Fam 10, Fam 11, Fam 12 y Fam 13) se ajustaron a la proporción esperada de

alelos 3:1 y el genotipo de ambos padres sería ab, un 53,3 % (Fam 1, Fam 2, Fam 6, Fam 7, Fam 11, Fam 14) se ajustaron a la proporción esperada 1:1 y los genotipos de los progenitores serían aa y ab y un 6,7% (Fam 8) no segregó para este marcador, siendo los posibles genotipos de los progenitores aa y bb, ab y bb o bb y bb. La Fam 8 sería una excelente fuente de resistencia para verruga al presentar la totalidad de su progenie (34 genotipos) la presencia del marcador y por tanto presentarían a su vez el gen de resistencia a verruga.

Resistencia a *P. infestans*

El marcador GP94 que co-localiza con el gen *Rpi-phi1* de resistencia a *P. infestans*, amplificó una banda de 350 bp (figura 1E). No hubo un ajuste a ninguna proporción esperada en 46,7% de las familias (Fam 2, Fam 4, Fam 7, Fam 10, Fam 11, Fam 14 y Fam 15), un 6,7% de las familias (Fam 13) segregó y se ajustó a la proporción 3:1 y el genotipo de ambos padres sería ab (tabla 4). Finalmente, otro 46,7 % de las familias no segregó para este marcador (Fam 1, Fam 3, Fam 5, Fam 6, Fam 8, Fam 9 y Fam 12). Las familias que no segregaron serían una excelente fuente de resistencia para tizón al presentar la totalidad de su progenie (311 genotipos) la presencia del marcador y por tanto presentarían a su vez el gen de resistencia a tizón.

Finalmente, el marcador RYSC3 que co-localiza con el gen *Ry_{adg}* de resistencia al virus PVY y amplifica una banda de 320 bp, no amplificó en ninguna de las familias evaluadas.

Análisis de correlación

En la publicación se reportaron únicamente las correlaciones altamente significativas ($p < 0,01$).

El análisis de correlación para los caracteres evaluados en cada familia (tabla 5) mostró que en la Fam1 existe una correlación negativa y moderada ($r = -0,69$) entre la resistencia al virus PVX y la uniformidad de tubérculos (Uttub). Esto estaría indicando que los clones con resistencia a PVX, no mostraron Uttub. Así mismo, se observó una correlación positiva y moderada ($r = 0,53$) entre la resistencia a *G. rostochiensis* (Gro1-4) y *S. endobioticum* (NL25), indicando esto que los clones de esta familia amplificaron ambos marcadores y probablemente tengan resistencia conjunta a ambos factores.

La Fam 4 mostró una correlación positiva y alta ($r = 0,73$) entre la resistencia a *G. rostochiensis* y el Virus PVX. Asimismo, se observó una correlación positiva y moderada ($r = 0,43$) entre *P. infestans* y *G. pallida*. Esto está indicando que varios de los clones de esta familia con resistencia a *G. rostochiensis* serían a su vez resistentes al Virus PVX y que los clones resistentes a *G. pallida* también serían resistentes a PVX.

En la Fam 5 se observó una correlación moderada y negativa ($r = -0,59$) entre la resistencia a PVX y el número

ro de tubérculos (Ntub), correlaciones altas y negativas ($r=-0,81$ y $-0,74$) entre la resistencia a PVX y el peso (Ptub) y volumen de tubérculos (Vtub) respectivamente y una correlación alta y positiva ($r=0,74$) entre la resistencia a PVX y la forma del tubérculo (Ftub). Esto significa, que los clones con resistencia a PVX en la Fam 5, presentan a su vez bajo número, peso y volumen de tubérculos y forma de tubérculos alargados.

La Fam 6 mostró una correlación positiva y moderada ($r=0,48$) entre la resistencia a *G. rostochiensis* y PVX. Esto indicó que los clones en esta familia tuvieron resistencia conjunta al nematodo dorado y virus PVX.

La Fam 8 mostró una correlación perfecta y positiva ($r=1$) entre la resistencia al virus PVX, tizón (*P. infestans*) y verruga (*S. endobioticum*), lo que indica que todos los clones de esta familia tendrían resistencia conjunta a estos tres factores bióticos.

La Fam 10 mostró una correlación moderada y negativa ($r=0,42$) entre la resistencia a *G. pallida* y Ntub, lo que denota que clones resistentes al nematodo blanco mostraron menos tubérculos.

La Fam 12 presentó una correlación moderada y positiva ($r=0,53$) entre la resistencia a nematodo-quiste

(*G. pallida*) y la verruga (*S. endobioticum*). Esto indica que los clones resistentes al nematodo blanco en esta familia serían a su vez resistentes a verruga.

La Fam 13 mostró una correlación moderada positiva y significativa ($r=0,49$) correlación entre la resistencia a verruga (*S. endobioticum*) y el virus PVX. Esto muestra que los clones resistentes a verruga presentarían también resistencia a PVX.

La Fam 14 presentó una correlación moderada y positiva ($r=0,48$) entre la resistencia a tizón (*P. infestans*) y verruga (*S. endobioticum*). Esto indica que los clones resistentes a tizón en esta familia presentarían resistencia conjunta a verruga.

Finalmente la Fam 15 presentó una correlación moderada y positiva ($r=0,44$) entre la resistencia a verruga (*S. endobioticum*) y el virus PVX. Así mismo presentó una correlación moderada y negativa ($r=-0,43$) entre la resistencia a la verruga y Uttub. Finalmente se observó una correlación moderada y positiva ($r=0,43$) entre la resistencia a *G. pallida* y Vtub. Esto significa que los clones con resistencia a verruga también son resistentes a PVX; sin embargo, presentarían mala uniformidad del tamaño de los tubérculos. Por otra parte, los clones

Tabla 5. Coeficientes de correlación de Pearson y Spearman para cinco marcadores moleculares de diagnóstico para resistencia a cinco factores bióticos en 15 familias híbridas de papa y seis características agronómicas y morfológicas.

Marcador	Familia	GP94	NL25	CP60	Gro 1-4	HC	Ntub	Ptub	Vtub	Cctub	Uttub	Ftub
HC.	Fam10						-0,42**					
	Fam12		0,53**									
Gro1-4	Fam1		0,56**									
	Fam4			0,73**								
	Fam6			0,48**								
CP60	Fam1										-0,69**	
	Fam5						-0,59**	-0,81**	-0,74**			0,74**
	Fam8	1**	1**									
GP94	Fam4					0,43**						
	Fam8		1**									
	Fam14		0,48**									
NL25	Fam1									0,35**		
	Fam13			0,49**								
	Fam15			0,44**					0,43**		-0,43**	

Leyendas: GP94= Marcador para gen R a *Phytophthora infestans*, NL25= Marcador para gen R a *Synchytrium endobioticum*, Cp60= Marcador para gen R a PVX, Gro1-4= Marcador para gen R a *Globodera rostochiensis*, HC= Marcador para gen R a *Globodera pallida*, G.p.=*G. pallida*, G.r.=*G. rostochiensis*, P.i.=*P. infestans*, S.e.=*S. endobioticum*, Ntub= Número de tubérculos, Ptub= Peso de tubérculos, Vtub= Volumen de tubérculos, TTub= Tamaño de tubérculos, Cptub= Color de piel del tubérculo, Cctub= Color de carne del tubérculo, Protub= Profundidad de ojos del tubérculo, Uttub= Uniformidad de tamaño del tubérculo y Ftub= Forma del tubérculo

resistentes al nematodo blanco presentarían un mayor volumen de tubérculos.

Genotipos seleccionados

El agrupamiento clúster de los 824 genotipos, generó siete grupos, de los cuales, el grupo 4 que esta representado en la tabla 6; mostró 107 genotipos con resistencia a PVX, *P. infestans*, *G. rostochiensis* y *S. endobioticum*, alto rendimiento, mayor número de tubérculos, mayor volumen de tubérculos y ojos superficiales. Estos genotipos, serán sembrados en campo para su posterior evaluación.

Discusión

En este estudio se utilizó marcadores moleculares co-localizados con genes de resistencia a los virus PVY, PVX, al nematodo-quiste (*G. pallida*, *G. rostochiensis*), al tizón (*P. infestans*) y la verruga (*S. endobioticum*) que se encuentran en los cromosomas: V, VII, IX, XI y XII (Brigneti et al., 1997, Hämäläinen et al., 1997, Ritter et al., 1991, Barone et al., 1990, Gebhardt et al., 1993).

Los resultados mostraron que cinco de los marcadores moleculares utilizados (HC, Gro 1-4, NL25, GP94 y CP60) amplificaron la banda en más del 80 % de las poblaciones. Por lo que parece, fue un método eficiente para identificar clones con posible resistencia a estas enfermedades; sin embargo, existe la probabilidad de que no haya correspondencia entre la expresión esperada para el marcador y el fenotipo. Es decir que aquellos genotipos que presentan la banda no expresen el gen de resistencia y sean en realidad susceptibles o que aquellos que no la presenten expresen el gen de resistencia. Desde la perspectiva de un mejorador, es peor conservar material susceptible clasificado como resistente, que haberse deshecho de genotipos resistentes clasificados como susceptibles (López-Pardo et al., 2013). El primer caso tiene una explicación en que la obtención de variedades mejoradas está basada en la obtención de cientos y miles de genotipos de diferentes cruzamientos. En tal poza genética amplia, la predicción de un fenotipo resistente basado en el genotipo del marcador no es sencilla, debido a las múltiples generaciones de recombinación meiótica que separaron a los individuos en dicha poza genética, un equilibrio de ligamiento podría haberse alcanzado entre un gen específico de resistencia y un marcador estrechamente ligado a dicho gen; en otras palabras, un alelo marcador conocido por co-heredarse con el gen de resistencia en una cruce dada podría no co-heredarse con dicho gen en una poza genética amplia (Niewöhner et al., 1995).

Otro aspecto que hace que los marcadores ligados al rasgo de interés en poblaciones de mapeo sean inefectivos en otras poblaciones es que la papa es una especie difícil para la mejora genética, debido a que es poliploide, autoincompatible y altamente heterociga.

Además, muchos rasgos de interés en papa son poligénicos y altamente influenciados por el medio ambiente (Mullins et al., 2006). Si las funciones de otros genes tales como genes complementarios son esenciales para la expresión de la resistencia, algunas variedades seleccionadas solo en base a marcadores moleculares podrían no mostrar resistencia. Por lo anterior mencionado, en nuestro caso es muy importante evaluar la resistencia de los genotipos que presentan el marcador. Esto se realizará en un siguiente ciclo bajo condiciones de campo. Esto debido a que la expresión de la resistencia puede ser difícil de evaluar dado que factores ambientales, de desarrollo, estado fisiológico de la planta y la concentración del inoculo influenciarían el fenotipo. Es por ello que es muy importante evaluar la resistencia bajo condiciones de campo o bajo condiciones controladas que reflejen las condiciones de campo (Bernaola, 2008).

La resistencia al virus PVY, es simple y está gobernada por genes R mayores que le confiere un tipo de resistencia monogénica (Fernández – Northcote, 1991; Mendoza et al., 1996; Mihovilovich et al., 1998). En el presente trabajo se observó que ninguna de las 15 poblaciones evaluadas amplificó la banda de 320 bp del marcador RYSC3 que co-localiza con el gen *Ry^{adg}* de resistencia al virus PVY. Esto podría deberse a que entre las líneas parentales utilizadas para generar estas poblaciones no se involucró a variedades de *S. andigena* (tabla 1), en la cual se ha identificado este gen de resistencia. En nuestro caso habría sido mejor utilizar el marcador GP122₅₆₄ que también confiere extrema resistencia a PVY pero cuya fuente de resistencia es *S. stoloniferum*. La utilidad de un sistema de marcadores disminuiría al aumentar la distancia filogenética de la especie en estudio con la especie en la que se identificó originalmente los marcadores (Oberhagemann et al., 1999). Cuando un marcador se utiliza fuera de la especie originaria, el locus puede ser monomórfico o puede no amplificar. Collins et al. (1999) reportan que existen especies a las cuales es difícil transferir marcadores de otras especies.

En referencia a las segregaciones para PVX, verruga (*S. endobioticum*) y tizón (*P. infestans*), solamente la Fam 8 no exhibió segregación para la amplificación de las bandas del marcador en las tres enfermedades. Esta familia presentaría ambos progenitores resistentes y su progenie sería 100 % resistente. Sin embargo, falta confirmar esta resistencia en el fenotipo. En el caso particular del tizón, siete familias no presentaron segregación para el marcador GP94. Esto tiene explicación en que el gen *Rpi-phu1* se origina de un híbrido inter específico entre *S. stenotomum* y *S. phureja*, especies que son parte del origen genético de estas familias.

Por otra parte, para todos los marcadores, se observaron poblaciones cuyas proporciones de segregación estuvieron significativamente desviadas. Las proporciones de segregación desviadas son usualmente ob-

Tabla 6. Ciento siete clones provenientes de 15 familias interespecíficas agrupados de acuerdo a la presencia de cinco marcadores ligados a genes de resistencia a factores bióticos y características agronómicas y morfológicas.

Clon	GP94	NI25	CP60	Gro1-4	HC	Ntub	Ptub	Vtub	Ttub	Cptub	Cctub	Potub	Uttub	Ftub
311209.16	1	1	1	1	0	54	0,08	203	5	6	6	5	2	3
311100.19	1	0	1	0	1	52	0,08	201	3	6	2	5	2	2
311024.31	1	1	1	0	0	37	0,09	206	3	1	2	5	2	2
311209.30	1	0	1	1	0	38	0,08	200	3	1	2	5	2	2
311024.56	1	1	1	1	0	37	0,09	208	3	6	6	5	2	2
311024.65	1	1	1	1	0	32	0,08	210	5	1	2	5	2	2
311024.66	1	1	1	0	1	32	0,09	208	5	5	2	5	2	2
311209.17	1	1	1	1	1	30	0,09	209	5	1	4	5	2	2
311024.18	1	1	1	0	1	31	0,08	206	3	6	2	5	2	2
311209.03	1	1	1	1	1	30	0,09	208	3	6	2	5	2	2
311022.14	1	1	1	1	1	32	0,10	210	3	6	4	5	2	2
311209.32	1	1	1	1	0	37	0,09	217	3	5	2	5	2	1
311080.35	1	1	1	1	1	24	0,07	190	3	8	2	5	2	6
311081.33	1	1	1	0	1	24	0,05	191	3	6	2	5	3	1
311024.55	1	1	1	1	0	24	0,07	190	3	1	2	5	2	2
311340.28	1	1	1	0	1	23	0,06	190	3	8	2	3	2	6
311340.44	1	1	1	0	1	23	0,08	190	3	5	1	3	2	6
311035.02	1	1	1	0	1	23	0,07	192	3	5	2	3	2	6
311340.05	1	1	0	0	0	21	0,07	192	3	5	2	3	2	6
311024.74	1	1	1	1	1	23	0,06	188	3	1	2	5	2	2
311340.06	1	1	1	0	1	22	0,06	187	3	5	2	5	2	2
311081.23	1	1	1	1	0	23	0,05	187	5	5	2	5	2	2
311024.59	1	1	1	1	0	21	0,07	190	3	6	1	5	2	2
311209.47	1	1	1	1	0	20	0,07	190	3	1	2	5	2	1
311209.36	1	1	1	0	1	21	0,07	190	3	5	2	5	2	2
311209.06	1	1	1	0	0	20	0,07	190	3	4	4	5	2	2
311102.36	1	0	1	0	1	19	0,07	190	3	8	1	5	2	5
311081.35	1	1	1	1	0	26	0,06	190	1	5	4	5	2	1
311209.11	1	1	1	0	1	27	0,07	190	3	6	4	5	2	2
311209.28	0	0	0	0	0	27	0,07	190	3	6	4	5	2	6
311022.03	1	1	1	1	1	26	0,09	191	3	5	2	5	2	2
311024.58	1	1	1	1	0	28	0,08	192	3	2	2	5	2	2
311102.56	1	1	1	1	0	27	0,06	189	3	8	1	5	2	5
311024.63	1	1	1	1	1	22	0,07	194	5	1	2	5	2	2
311081.28	1	1	1	1	1	21	0,06	195	5	6	2	5	3	6
311100.48	1	1	1	0	0	22	0,07	195	3	8	1	5	2	2
311022.01	1	1	1	1	0	22	0,07	193	3	1	2	5	2	2
311209.37	0	1	1	0	0	24	0,07	193	3	1	2	5	2	2
311022.10	1	1	1	1	1	27	0,08	195	3	5	2	3	2	6
311340.17	1	1	1	0	1	28	0,08	195	3	5	2	3	2	6
311340.04	1	1	1	0	1	27	0,07	197	3	1	2	3	2	6
311022.06	1	1	1	1	1	26	0,08	194	3	1	2	5	2	2
311209.33	1	0	1	1	1	26	0,07	195	3	7	4	5	2	1
311209.02	1	1	1	1	1	30	0,08	198	3	1	2	5	2	1
311209.38	0	1	1	0	0	31	0,08	200	3	5	2	5	2	6
311028.10	1	0	0	0	1	31	0,09	200	3	6	4	5	2	2
311024.39	1	1	1	0	1	34	0,08	198	3	5	1	5	2	2
311340.02	1	1	1	0	1	35	0,08	198	3	1	2	3	2	6
311022.08	1	1	0	1	1	32	0,08	196	3	5	1	5	3	2
311024.61	1	1	1	1	0	33	0,08	195	3	5	2	5	2	2
311100.51	1	0	1	0	1	31	0,08	200	3	8	2	5	2	2
311024.37	1	1	1	1	1	35	0,07	188	3	5	2	5	2	2
311209.09	1	1	1	0	1	35	0,07	191	3	6	2	5	2	1
311100.52	1	0	0	0	0	33	0,06	189	3	8	1	5	2	2
311340.01	1	1	0	0	0	32	0,06	189	3	1	2	3	2	6
311340.03	1	1	0	0	1	30	0,07	190	3	5	2	3	2	6
311022.09	1	1	1	1	1	30	0,07	192	3	2	2	5	2	2

Clon	GP94	NI25	CP60	Gro1-4	HC	Ntub	Ptub	Vtub	Ttub	Cptub	Cctub	Potub	Uttub	Ftub
311022.18	1	1	1	1	1	32	0,09	192	3	5	2	5	2	6
311022.05	1	1	1	1	1	31	0,08	190	3	2	2	5	2	2
311209.07	1	1	1	1	1	32	0,07	190	3	4	2	5	2	1
311081.36	1	1	1	1	1	31	0,06	189	1	5	4	5	2	1
311102.26	0	1	1	1	0	28	0,08	193	5	8	2	5	2	6
311209.39	1	1	1	0	0	31	0,07	189	3	1	4	5	2	6
311340.14	1	1	1	0	1	28	0,06	189	3	5	2	5	2	2
311024.04	1	1	1	1	1	23	0,06	178	3	1	2	5	2	2
311102.46	1	1	1	1	1	23	0,05	177	3	5	2	5	2	5
311340.11	1	1	1	0	1	22	0,05	178	3	1	2	3	2	6
311423.04	1	0	1	0	1	22	0,06	178	3	6	4	5	2	6
311022.20	1	1	1	1	0	23	0,06	182	3	5	2	5	2	2
311024.36	1	1	1	1	0	24	0,06	182	3	5	2	5	2	2
311102.37	1	1	1	0	0	25	0,07	180	3	5	3	5	2	6
311081.18	1	1	1	0	1	21	0,05	182	3	5	2	5	2	1
311340.45	1	1	1	0	1	22	0,06	182	3	1	1	5	2	2
311024.02	1	1	1	1	1	21	0,06	180	3	1	2	5	2	2
311024.12	1	1	1	1	1	21	0,06	180	5	1	2	5	2	2
311028.03	1	1	1	1	1	20	0,06	180	3	6	2	5	2	2
311102.16	1	0	1	0	1	21	0,05	180	3	8	1	5	2	6
311081.22	1	1	1	1	0	22	0,04	180	3	6	2	5	2	2
311024.72	1	1	1	1	1	30	0,06	184	3	6	2	5	2	2
311340.24	1	1	0	0	1	28	0,06	183	3	8	1	3	2	6
311081.47	1	1	1	1	0	28	0,05	178	1	8	2	5	2	1
311102.66	1	1	1	1	1	26	0,05	178	5	8	1	5	2	7
311340.09	1	1	1	0	0	26	0,05	178	3	6	1	3	2	6
311022.13	1	1	1	1	1	28	0,06	179	3	1	2	5	2	2
311028.60	1	1	1	1	1	28	0,06	180	1	5	2	5	2	2
311100.36	1	0	1	0	1	27	0,06	180	3	6	2	5	2	5
311022.22	1	0	1	1	1	28	0,06	178	3	6	2	5	2	6
311340.12	1	1	1	0	1	29	0,06	180	3	8	2	3	2	6
311340.15	1	1	1	0	0	27	0,06	180	3	1	2	3	2	6
311024.05	1	1	1	1	1	31	0,07	184	3	6	2	5	2	2
311340.16	1	1	1	0	1	29	0,06	183	3	5	2	3	2	6
311028.04	1	1	1	1	1	29	0,06	182	3	8	4	5	2	2
311024.21	1	1	1	0	1	26	0,06	184	3	5	2	5	2	2
311024.50	1	1	1	1	1	26	0,06	184	3	2	2	5	2	2
311340.22	1	1	1	0	0	26	0,06	186	3	5	2	3	2	6
311022.21	1	1	1	1	1	39	0,07	184	3	1	2	5	2	2
311209.13	1	1	1	0	0	43	0,07	188	1	1	2	5	2	1
311024.45	1	1	0	1	0	40	0,06	184	3	5	2	5	2	2
311100.61	1	0	1	0	0	43	0,08	190	3	5	2	5	2	2
311085.02	1	1	0	0	1	38	0,08	190	3	1	1	5	2	6
311340.08	1	1	1	0	1	40	0,06	171	1	8	2	5	2	2
311340.36	1	1	1	0	1	40	0,10	170	1	5	4	5	2	2
311022.23	1	1	1	1	0	31	0,06	180	3	5	4	5	2	2
311022.24	1	1	1	1	0	33	0,06	178	3	2	4	5	2	2
311024.06	1	1	1	1	1	36	0,05	174	3	6	2	5	2	2
311340.26	1	1	1	0	1	37	0,05	179	1	1	2	5	2	2
311102.05	1	1	1	1	1	43	0,06	178	3	5	1	5	2	6

Leyendas: GP94= Marcador para gen R a *Phytophthora infestans*, NI25= Marcador para gen R a *Synchytrium endobioticum*, Cp60= Marcador para gen R a PVX, Gro1-4= Marcador para gen R a *Globodera rostochiensis*, HC0 Marcador para gen R a *Globodera pallida*, Ntub= Número de tubérculos, Ptub= Peso de tubérculos, Vtub= Volumen de tubérculos, Ttub= Tamaño de tubérculos, Cptub= Color de piel del tubérculo, Cctub= Color de carne del tubérculo, Potub= Profundidad de ojos del tubérculo, Uttub= Uniformidad de tamaño del tubérculo y Ftub= Forma del tubérculo

servadas en papa (Gebhardt *et al.*, 1991; van Eck *et al.*, 1995; El Kharbotly *et al.*, 1994) y podrían resultar del ligamiento con factores letales balanceados (Bianchi *et al.*, 1962). Asimismo, el parental susceptible o portador de alelos de susceptibilidad también juega un rol importante en la modificación y en la supresión del fenotipo de resistencia observadas en la progenie, dependiendo del parental susceptible con el que es cruzado (Ross, 1986; El Kharbotly *et al.*, 1996).

En progenies que segregan para resistencia cuantitativa (caso del tizón y nematodos) niveles de resistencias mayores o menores presentes en los parentales, pueden ser expresados (Ross, 1986; Leonards-Schippers, 1994). De igual manera puede pasar con la epístasis entre QTL de resistencia. Un ejemplo de este aspecto es la resistencia en *Capsicum annum* "pimienta" a *Phytophthora capsici* donde se detectó dos QTLs de efecto aditivo y al menos cuatro QTLs epistáticos provenientes del progenitor susceptible que eran favorables para la resistencia (Lefebvre *et al.*, 1996).

En el caso del nematodo-quiste, el análisis de la resistencia se complica porque estos son caracteres poligénicos gobernados por genes menores de herencia cuantitativa (Ross, 1996). En este estudio se observaron poblaciones que no se ajustaron a ninguna segregación esperada. Una de estas poblaciones presentaba mayor proporción de susceptibles (ausencia de banda) que de resistentes a *G. pallida*. Esto podría ser debido a que los parentales fueron homocigóticos susceptibles y contrariamente a lo esperado algunos individuos de la progenie amplificaron la banda. Esto concuerda con Asano (2006), quien encontró amplificación de bandas del marcador HC aún cuando los genotipos expresaron susceptibilidad. Sin embargo, en el caso del nematodo-quiste, también observamos una familia que presentó mayor proporción de susceptibles que de recesivos, tal como si el gen de susceptibilidad fuese dominante sobre el de resistencia. Algunos marcadores no son aplicables para la evaluación de accesiones resistentes. Esto tal vez debido al complejo origen genético de la papa como señalan Milczarek *et al.* (2011). Ellos evaluaron marcadores moleculares publicados y sugirieron que la mayoría de los marcadores no eran aplicables debido a orígenes genéticos complejos.

El análisis de correlación mostró relaciones interesantes entre caracteres comerciales y la presencia de estos cinco marcadores. Los marcadores que más asociaciones con caracteres comerciales expresaron fueron los marcadores CP60 y NL 25. Ambos marcadores estuvieron positivamente asociados con la presencia de los marcadores Gro 1-4 y GP94, uniformidad y menor número de tubérculos. Esto significaría que los genotipos con resistencia a PVX y verruga (*S. endobioticum*) podrían a su vez presentar resistencia a tizón (*P. infestans*) y nematodo-quiste (*G. rostochiensis*) y menor número pero mayor uniformidad del tamaño de tubérculos.

Asimismo, también se observó la relación entre la presencia del marcador GP94 y el marcador HC. Lo cual significaría que las resistencias tanto a tizón como al nematodo blanco podrían co-heredarse. Esto podría explicarse en el sentido de que uno o más miembros de la familia R1 de genes para resistencia al tizón, podrían estar compartiendo la base molecular con el gen *Rpi-phu1*; asimismo, son buenos candidatos posicionales para la base molecular de los genes para resistencia a nematodos ubicados en el cromosoma V (*RCp5-vrn*) donde está el gen *R1*. Se sabe que la mayoría de los genes R fueron introducidos de especies silvestres (Mosquera *et al.*, 2008). Catorce de ellos se encuentran en *hot spots* (puntos concentrados) para resistencia y confieren resistencia a varios patógenos. A la fecha se han identificado cinco *clúster* (grupos) de resistencia. En una planta se encuentra un gran repertorio de genes de resistencia R, ubicados en diferentes sitios del genoma (Mosquera *et al.*, 2008). Estos genes expresan diferentes proteínas que pueden ser agrupadas en varias familias. La mayoría de proteínas R contienen repeticiones en grupos, ricas en leucina (LRR). Se plantea la co-localización de genes R y QTLs en diferentes cromosomas. Una hipótesis señala que los QTLs son variantes alélicas con efecto menos extremo que los genes R y una segunda hipótesis plantea que los QTLs de resistencia mapean en regiones del genoma que contienen genes de función conocida involucrados en la respuesta general al ataque de patógenos.

Considerando que normalmente cada año, en un programa de mejoramiento genético se evalúan muchos miles de plántulas para iniciar un nuevo ciclo de selección, técnicas de extracciones de ADN, PCR y electroforesis son todavía relativamente costosas, a pesar de que los precios han bajado y las posibilidades de automatización han mejorado sustancialmente. En este sentido, Gebhardt *et al.* (2006) y López-Pardo (2013) recomiendan que la resistencia a patógenos se deba combinar con un buen desempeño de las progenies en campo. Por lo que progenies F₁ deberían seleccionarse en campo bajo presión de patógenos durante 2 a 3 años, lo que reduce drásticamente el número de clones para la aplicación de técnicas de detección molecular. La aplicación de SAM en un programa de mejoramiento genético de papa dependerá del análisis del costo-beneficio para cualquier esquema de mejoramiento particular (Ortega y López-Vizcón, 2012). En este contexto, es necesario reducir aún más los costos para SAM mediante el desarrollo de marcadores y protocolos, que permitan PCRs multiplex (Witek *et al.*, 2006; Asano *et al.*, 2006) e incluso otros métodos diagnóstico basados en la hibridación, como el DArTs que permite detectar muchos marcadores y sus alelos en un momento dado (Jing *et al.*, 2009). En conclusión, la aplicación eficaz de la SAM en papa requiere el desarrollo de marcadores dentro de los genes de resistencia, así como la tecnología de costo eficiente (López-Pardo *et al.*, 2013).

Las familias en estudio provienen de un programa de biofortificación para incrementar los niveles de Fe y Zn, por lo que es muy probable identificar genotipos que reúnan las características de resistencias descritas y altos niveles de estos micronutrientes. No se conoce en papa aun si existe correlación entre la concentración de micronutrientes y resistencia a enfermedades. La determinación fenotípica de las concentraciones de Fe y Zn permitirá establecer si existe o no correlaciones con las resistencias previamente descritas.

Agradecimientos

Este trabajo fue desarrollado por la Fundación PROINPA, en el sub-proyecto "Desarrollo de variedades con tolerancia a factores bióticos" ejecutado en el marco del Programa Nacional de Papa del INIAF. Se realizó con ayuda financiera del Banco Mundial y el apoyo técnico del CIP-IssAndes. Las opiniones expresadas en el mismo no reflejan necesariamente la opinión oficial de estas instituciones.

Referencias bibliográficas

Asano, K.; Kobayashi, A.; Tsuda, S.; Nishinaka, M.; Tamiya, S. (2012). DNA marker-assisted evaluation of potato genotypes for potential resistance to potato cyst nematode pathotypes not yet invading into Japan. *Breeding Science*, 62(2),142-150.

Barone, A.; Ritter, E.; Schachtschabel, U.; Debener, T.; Salamini, F.; Gebhardt, C. (1990). Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a mayor dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol Gen Genet*, 224, 177-182.

Bendahmane, A.; Kanyuka, K.; Baulcombe, D.C. (1997). High-resolution genetical and physical mapping of the Rx gene for extreme resistance to potato virus X in tetraploid potato. *Theoretical Applied Genetics*, 95, 153-162.

Bernaola, L. (2008). Caracterización molecular de la resistencia al tizón tardío en *Solanum paucissectum* Ochoa (Solanaceae) mediante el uso de la técnica NBS y marcadores para loci candidatos. Tesis de grado para obtener el título profesional de biólogo. 118 p.

Bianchi, A.; Morandi, A. (1962). A case of balanced lethal factors in maize. *Heredity*, 17, 409-414.

Bormann, C.A.; Rickert, A.M.; Castillo, R.A.; Paal, J.; Lübeck, J.; Strahwald, J.; Buhr, K.; Gebhardt, C. (2004). Tagging quantitative trait loci for maturity-corrected late blight resistance in tetraploid potato with PCR-based candidate gene markers. *Mol Plant Microbe Interactions*, 17(10), 1126-1138.

Brigneti, G.; García-Mas, J.; Baulcombe, D.C. (1997). Molecular mapping of the potato virus Y resistance locus Rysto in potato. *Theoretical Applied Genetics*, 94, 198-203.

Collins, A.; Milbourne, D.; Ramsay, L.; Meyer, R.; Chatot-Balandras, C.; Oberhagemann, P.; De Jong, W.; Gebhardt, C.; Bonnel, E.; Waugh, R. (1999). QTL for field resistance to late blight in potato are strongly correlated with maturity and vigour. *Molecular Breeding*, 5 (5), 387-398.

Colon, L.; Jansen, R.; Budding, D. (1995). Partial resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in hybrids progenies of four South American *Solanum* species crosses with diploid *S. tuberosum*. *Theoretical Applied Genetics*, 90, 691-698.

De Jong, W.; Forsyth, A.; Leister, D.; Gebhardt, C.; Baulcombe, D.C. (1997). A potato hypersensitive resistance gene against potato virus X maps to a resistance gene cluster on chromosome 5. *Theoretical Applied Genetics*, 95, 246-252.

Doyle, J.J.; Doyle, J.L. (1990). A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*, 12,13-15.

El-Kharbotly, A.; Leonards-Schippers, C.; Huigen, D.J.; Jacobsen, E.; Pereira, A.; Stiekema, W.J.; Salamini, F.; Gebhardt, C. (1994). Segregation analysis and RFLP mapping of the R1 and R3 alleles conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in progeny of dihaploid potato parents. *Mol Gen Genet*, 242, 749-754.

El-Kharbotly, A.; Palomino-Sánchez, C.; Salamini, F. (1996). R6 and R7 alleles of potato conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary identified genetic loci clustering with the R3 locus on chromosome XI. *Theoretical Applied Genetics*, 92, 880-884.

FAO, World agriculture; towards (2010). An FAO study, N. Alexandratos, FAO John Wiley & Sons. Rome, Italy.

Fernandez-Northcote, E. (1991). Mejoramiento por resistencia a los principales virus de la papa. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 4,1-21.

Gabriel, J. (2008). Aplicación de marcadores moleculares para el cribado de QTLs en diferentes fuentes de resistencia a tizón tardío (*Phytophthora infestans*) en papa. Tesis Doctoral, Universidad Pública de Navarra (UPNA), Pamplona, España. 109 p.

Gabriel, J.; Ruiz de Galarreta, J.I.; Lopez-Pardo, R.; Barandalla, L.; Alvarado, C.; Ritter, E. (2011). Short communication. Introgression of late blight (*Phytophthora infestans* L.) resistance from tuber-bearing *Solanum* wild species into cultivated potato. *Spanish J Agric Res*, 9 (1), 193-197.

Gebhardt, C.; Bellin, D.; Henselewski, H.; Lehmann, W.; Schwarzfischer, J.; Valkonen, J.P.T. (2006). Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theoretical Applied Genetics*, 112, 1458-1464.

Gebhardt, C.; Mugniery, D.; Ritter, E.; Salamini, F.; Bonnel, E. (1993). Identification of RFLP markers closely linked to the H1 gene conferring resistance to *Globodera rostochiensis* in potato. *Theoretical Applied Genetics*, 85, 541-544.

Gebhardt, C.; Valkonen, J.P.T. (2001). Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annu Rev Phytopathol*, 39, 79-102.

Hämäläinen, J.H.; Watanabe, K.N.; Valkonen, J.P.T.; Arihara, A.; Plaisted, R.L.; Pehu, E.; Miller, L.; Slack, S.A. (1997). Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y. *Theoretical Applied Genetics*, 94, 192-197.

Hehl, R.; Faurie, E.; Hesselbach, J.; Salamini, F.; Whitham, S.; Baker, B.; Gebhardt, C. (1999). TMV resistance gene N homologues are linked to *Synchytrium endobioticum* resistance in potato. *Theoretical Applied Genetics*, 98, 379-386.

INIA. (2009). Descriptores mínimos de papa (*Solanum* sp.). INIA, Lima, Perú. 19 p.

Jing, H. C.; Bayon, C.; Kanyuka, K.; Berry, S.; Wenzl, P.; Huttner, E.; Kilian, A.; Kosack, K.H. (2009). DArT markers: diversity analyses, genomes comparison, mapping and integration with SSR markers in *Triticum monococcum*. *BMC Genomics*, 2009, 458.

Kasai, K.; Morikawa, Y.; Sorri, V.A.; Valkonen, J.P.; Gebhardt, C.; Watanabe, K.N. (2000). Development of SCAR markers to the PVY resistance gene Ry_{adg} based on a common feature of plant disease resistance genes. *Genome*, 43, 1-8.

Kreike, C.M.; Kok-Westeneng, A.A.; Vinke, J.H.; Stiekema, W.J. (1996). Mapping of QTLs involved in nematode resistance, tuber yield and root development in *Solanum* sp. *Theoretical Applied Genetics*, 92, 463-470.

Leister, D.; Ballvora, A.; Salamini, F.; Gebhardt, C. (1996). A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nat Genet*, 14, 421-429.

Leonards-Schippers, C.; Gieffers, W.; Schäfer-Pregl, R.; Ritter, E.; Knapp S.J.; Salamini, F.; Gebhardt, C. (1994). Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a case study for QTL mapping in an allogamous plant species. *Genetics*, 137, 67-77.

Levebvre, V.; Palloix, A. (1996). Both epistatic and additive effects of QTL are involved in induced resistance to disease: a case study,

- the interaction pepper-*Phytophthora capsici* Leonian. *Theoretical Applied Genetics*, 93, 503-511.
- López-Pardo, R.; Barandalla, L.; Ritter, E.; De Galarreta, J.I. (2013). Validation of molecular markers for pathogen resistance in potato. *Plant Breeding*, 246-251.
- Mendoza, H.A.; Mihovilovich, E.J.; Saguma, F. (1996). Identification of triplex (YYYy) Potato virus Y (PVY) immune progenitors derived from *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Am. Potato J.*, 73, 13-19.
- Mihovilovich, E.J.; Salazar, L.F.; Saguma, F.; Bonierbale, M.W. (1998). Survey of the durability of extreme resistance to PVY derived from *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. Pp. 123-128 in CIP program report 1997-1998, Lima Perú.
- Milczarek, D.; Flis, B.; Przetakiewicz, A. (2011). Suitability of molecular markers for selection of potatoes resistant to *Globodera* spp. *Am. J Potato Res*, 88, 245-255
- Mosquera, T.; Fernández, C.; Martínez, L.; Acuña, A.; Cuéllar, D. (2008). Genética de la resistencia de la papa (*Solanum tuberosum*) a patógenos. Estado de arte. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 7-15.
- Mullins, E.; Milbourne, D., Petti, C.; Doyle-Prestwich, B.; Meade, C. (2006). Potato in the age of biotechnology. *Trends in Plant Sci*, 11, 254-260.
- Muñoz, F.J.; Plaisted, R.L.; Thurston, H.D. (1975). Resistance to potato virus Y in *Solanum tuberosum* spp. *andigena*. *Am Potato J.*, 52, 107-115.
- Niewöhner J, Salamini F, Gebhardt C. (1995). Development of PCR assays diagnostic for RFLP markers closely linked to alleles *Gro1* and *H1*, conferring resistance to the root cyst nematode *Globodera rostochiensis* in potato. *Mol. Breed.*, 1, 65-78
- Oberhagemann, P.; Chalot-Balandras, C.; Bonnel, E.; Schäfer-Pregl, R.; Wegener, D.; Palomino, C.; Salamini, F.; Gebhardt, C. (1999). A genetic analysis of quantitative resistance to late blight in potato: Towards marker assisted selection. *Mol Breeding*, 5, 399-415.
- Ortega, F.; López-Vizcón C.L. (2012). Application of molecular marker assisted selection (MAS) for disease resistance in a practical potato breeding programme. *Pot. Res.*, 54, 1-13.
- Paal, J.; Henselewski, H.; Muth, J.; Meksem, K.; Menéndez, C.M.; Salamini, F.; Ballvora, A.; Gebhardt, C. (2004). Molecular cloning of the potato *Gro1-4* gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach. *Plant J.*, 38, 285-297.
- Ritter, E.; Debener, T.; Barone, A.; Salamini, F.; Gebhardt, C. (1991). RFLP mapping on potato chromosomes of two genes controlling extreme resistance to potato virus X (PVX). *Mol Gen Genet*, 227, 81-85.
- Ritter, E.; Lucca, F.; Sánchez, I.; Ruiz de Galarreta, J.I.; Aragonés, A.; Castañón, S.; Bryan, G.; Waugh, R.; Lefebvre, V.; Rouselle-Bourgoise, F.; Gebhardt, C.; van Eck, H.J.; van Os, H.; Taco, J.; Bakker, J. (2005). Genomic resources in potato and possibilities for exploitation. Page 55-64 in *Potato in progress* (Eds.: Haverkort AJ & PC Struik), Wageningen Academic Publishers, Holanda.
- Ritter, E.; Ruiz de Galarreta, J.I.; Hernández, M.; Plata, G.; Barandalla, L.; Lopez, R.; Sanchez, I.; Gabriel, J. (2009). Utilization of SSR and cDNA markers for screening known QTLs for late blight (*Phytophthora infestans*) resistance in potato. *Euphytica*, 170, 77- 86.
- Ritter, E.; Ruiz de Galarreta, J.I.; van Eck, H.J.; Sánchez, I. (2008). Construction of a potato transcriptome map based on the cDNA-AFLP technique. *Theoretical Applied Genetics*, 7 (16), 1003-1013.
- Ross, H. (1962). Über die Vererbung der Resistenz gegen den Kartoffelnematoden (Heterodera rostochiensis Woll.) in Kreuzungen von *Solanum famatinae* Bitt. et Wittm. Mit *Solanum tuberosum* L. und mit *S. chacoense* Bitt. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 32(2), 74-80. Ross, H. (1986). Potato breeding-problems and perspectives. Page 1-132 in Horn, W y Röbbelen, G. (eds.). *Advances in Plant Breeding 13*. Berlin y Hamburgo.
- Roupe van der Voort, J.; van der Vossen, E.; Bakker, E.; Overmars, H.; van Zandvoort, P.; Hutten, R.; Klein Lankhorst, R.; Bakker, J. (2000). Two additive QTLs conferring broad spectrum resistance in potato to *Globodera pallida* are localized on resistance gene clusters. *Theoretical Applied Genetics*, 101, 1122-30.
- Roupe van der Voort, J.; Wolters, P.; Folkertsma, R.; Hutten, R.; van Zandvoort, P.; Vinke, H.; Kanyuka, K.; Bendahmane, A.; Jacobsen, E.; Janssen, R.; Bakker, J. (1997). Mapping of the cyst nematode resistance locus *Gpa2* using a strategy based on comigrating AFLP markers. *Theoretical Applied Genetics*, 95, 874-880.
- Sattarzadeh, A.; Achenbach, U.; Lübeck, J.; Strahwald, J.; Tacke, E.; Hofferbert, H.; Rothsteyn, T.; Gebhardt, C. (2006). Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping as basis for developing a PCR-based marker highly diagnostic for potato varieties with high resistance to *Globodera pallida* pathotype Pa2/3. *Mol Breed*, 18, 301-312.
- Sliwka, J.; Jakuczun, H.; Kamiński, P.; Zimnoch, E. (2010). Marker-assisted selection of diploid and tetraploid potatoes carrying *Rpi-phu1*, a major gene for resistance to *Phytophthora infestans*. *J Appl Genet.*, 51(2), 133-140.
- Sorri, V.A.; Watanabe, K.N.; Valkonen, J.P.T. (1999). Predicted kinase 3a motif of a resistance gene like fragment as a unique marker for PVY resistance. *Theoretical Applied Genetics*, 99, 164-170.
- SPSS. (2006). Guía breve de SPSS 15.0. para windows. SPSS inc., Chicago, USA. 176 p.
- Tommiska, T.J.; Hämäläinen, J.H.; Watanabe, K.N.; Valkonen, J.P.T. 1998. Mapping of the gene *Nxphu* that controls hypersensitive resistance to potato virus X in *Solanum phureja* IvP35. *Theoretical Applied Genetics*, 96, 840-843.
- Valdez - Moctezuma, E.; Kahl, G. (2005). Huellas de ADN en genomas de plantas. Mundi-Prensa, México, S.A. de C.V. Universidad Autónoma de Chapingo. 147 p.
- Van Eck, H.J.; Roupe van der Voort, J.; Draaistra, J.; van Zandvoort, P.; van Enckevort, E.; Segers, B.; Peleman, J.; Jacobsen, E.; Helder, J.; Bakker, J. (1995). The inheritance and chromosomal location of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Mol Breeding*, 1, 397-410.
- Veramendi, S.; Baldelomar, M.; Terán, A.; Gabriel, J. (2011). Marcadores moleculares asociados a genes/QTLs de resistencia para factores bióticos en nuevas variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) de Bolivia. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 16, (2), 209 - 232.
- Vidal, S.; Cabrera, H.; Andersson, R.A.; Fredriksson, A.; Valkonen, J.P.T. (2002). Potato gene Y-1 is an N gene homolog that confers cell death upon infection with Potato virus Y. *Mol Plant Microbe Interact.*, 15,717-727.
- Wastie, R.L. (1991). Breeding for resistance. In: D.D. Ingram and P.H. Williams (eds.). *Phytophthora infestans*, the Cause of Late Blight of Potato. Vol 7. Academic Press, London. Pp. 192-224.
- Whitham, S.; Dinesh-Kumar, S.P.; Choi, D.; Hehl, R.; Corr, R.; Baker, B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to Toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*, 78, 1101-1115.
- Witek, K.; Strzelczyk-Zyta, D.; Henning, J.; Marczewski, W. (2006). A multiplex PCR approach to simultaneously genotype potato towards the resistance alleles *Ry-f sto* and *Ns*. *Mol. Breed.*, 18, 273-275.

Protein disulfide isomerase and heat shock cognate protein 70 interactions with rotavirus structural proteins using their purified recombinant versions

Interacciones de las proteínas disulfuro isomerasa y de choque térmico Hsc70 con proteínas estructurales recombinantes purificadas de rotavirus

Luz Y. Moreno^{*}, Carlos A. Guerrero^{*}, Orlando Acosta^{*,**}

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57714

Abstract

Introduction. Rotavirus entry into cells seems to be mediated by sequential interactions between viral structural proteins and some cell surface molecules. However, the mechanisms by which rotavirus infects target cell are still not well understood. There is some evidence showing that rotavirus structural proteins VP5* and VP8* interact with some cell surface molecules. The availability of recombinant rotavirus structural proteins in sufficient quantity has become very important for the identification of the specific virus-cell receptor interactions during the early events of the infectious process.

Objective. The aim of the present work is to perform an analysis of the interactions between recombinant rotavirus structural proteins VP5*, VP8* and VP6, and cellular proteins Hsc70 and PDI using their purified recombinant versions.

Materials and methods. Rotavirus recombinant VP5* and VP8*, and cellular recombinant proteins Hsc70 and PDI were expressed in *E. coli* BL21(DE3) while VP6 was expressed in recombinant vaccinia virus-transfected MA104 cells. The interaction between rotavirus and cellular proteins was studied using ELISA, co-immunoprecipitation and SDS-PAGE/Western blotting analysis.

Results. The optimal conditions for expression of recombinant proteins were determined and antibodies were raised against them. The findings suggested that viral proteins rVP5* and rVP6 interact with Hsc70 and PDI *in vitro*. These viral recombinant proteins were also found to interact with raft-associated Hsc70 in a cell culture system. The treatment of cells with either rVP6 or DLPs produced significantly inhibition of rotavirus infection.

Conclusion. The results allow us to conclude that rVP5* and rVP6 interact with Hsc70 and PDI during the rotavirus infection process.

Key words: rotavirus; recombinant proteins; protein disulfide isomerase; heat shock cognate protein 70

Resumen

Introducción. La entrada de rotavirus a las células parece estar mediado por interacciones secuenciales entre las proteínas estructurales virales y algunas moléculas de la superficie celular. Sin embargo, los mecanismos por los cuales el rotavirus infecta la célula diana aún no se comprenden bien. Existe alguna evidencia que muestra que las proteínas estructurales de rotavirus VP5* y VP8* interactúan con algunas moléculas de la superficie celular. La disponibilidad de las proteínas estructurales de rotavirus recombinantes en cantidad suficiente se ha convertido en un aspecto importante para la identificación de las interacciones específicas de los receptores virus-célula durante los eventos tempranos del proceso infeccioso.

Objetivo. El propósito del presente trabajo es realizar un análisis de las interacciones entre las proteínas estructurales de rotavirus recombinante VP5*, VP8* y VP6, y las proteínas celulares Hsc70 y PDI utilizando sus versiones recombinantes purificadas.

Materiales y métodos. Las proteínas recombinantes de rotavirus VP5* y VP8* y las proteínas recombinantes celulares Hsc70 y PDI se expresaron en *E. coli* BL21 (DE3), mientras que VP6 se expresó en células MA104 con virus vaccinia

* Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

** Correspondence autor: C. A. Guerrero, caguerrero@unal.edu.co

recombinante transfectada. La interacción entre el rotavirus y las proteínas celulares se estudió mediante ELISA, co-inmuno-precipitación y SDS-PAGE/ Western.

Resultados. Las condiciones óptimas para la expresión de proteínas recombinantes se determinaron y se generaron anticuerpos contra ellas. Los resultados sugirieron que las proteínas virales rVP5* y rVP6 interactúan con Hsc70 y PDI *in vitro*. También se encontró que éstas proteínas virales recombinantes interactúan con Hsc70 en las balsas lipídicas ("Rafts") en un cultivo celular. El tratamiento de las células, ya sea con DLP o rVP6 produjo significativamente la inhibición de la infección por rotavirus.

Conclusión. Los resultados permiten concluir que rVP5* y rVP6 interactúan con Hsc70 y PDI durante el proceso de la infección por rotavirus.

Palabras clave: rotavirus; proteínas recombinantes; proteína disulfuro isomerasa; proteína de choque térmico Hsc70

Recibido: marzo 15 de 2015

Aprobado: abril 15 de 2016

Introduction

Rotavirus infection has been recognized as the leading cause of severe dehydrating diarrhea in infants and young children worldwide (Parashar *et al.*, 2006; Espósito *et al.*, 2011), being responsible for more than half a million annual deaths globally (Parashar *et al.*, 2006). Rotaviruses are non-enveloped viruses containing an 11-segmented double-stranded (ds) RNA genome enclosed by a triple-layered protein capsid (Pesavento *et al.*, 2006; Estes *et al.*, 2007). The outermost protein layer is composed by VP4 and VP7 while the intermediate layer consists of VP6. The innermost layer is built from VP2 which encloses the dsRNA segmented genome, and VP1 and VP3. VP4 requires to be cleaved into two trypsin proteolytic products, VP5* and VP8*, for the virus becomes infectious (Estes *et al.*, 1981; Benureau *et al.*, 2005).

Rotaviruses exhibit a remarkable tropism for polarized mature enterocytes from the small intestinal villus epithelium (Ramig 2004). However, primary small intestinal epithelial cell (IEC) cultures have been little used for rotavirus infection purposes (Kaushik *et al.*, 2008; Coulson *et al.*, 2002; Macartney *et al.*, 2000); most studies about rotavirus infection mechanism have been conducted in cultured cell systems such as MA104 cells, a non-differentiated kidney epithelial cell line (Guerrero *et al.*, 2000; Londrigan *et al.*, 2000; Halasz *et al.*, 2008). The polarized epithelial cell line Caco-2 derived from a human colon adenocarcinoma (Fogh *et al.*, 1977) has been also used as a model for studying the mechanisms by which rotaviruses affect intestinal functions (Servin *et al.*, 2003; De Marco *et al.*, 2009; Beau *et al.*, 2007). It has been shown that rotavirus can replicate in Caco-2 cells being then released without destroying them (Jourdan *et al.*, 1997).

The mechanisms by which rotavirus infects target cell are still not well understood. Rotavirus entry seems to be mediated by sequential interactions between viral structural proteins and some cell surface molecules (Lopez *et al.*, 2006). There is evidence showing that sialic acid (SA) interacts with VP8*, the smaller trypsin cleavage product of VP4, during the initial virus binding to cell surface (Isa *et al.*, 2006; Haselhorst *et al.*,

2009). Integrin $\alpha 2\beta 1$ has been also found to mediate binding to cells for some rotavirus strains through direct interaction with VP5*, the larger trypsin proteolytic product of VP4 (Méndez *et al.*, 1993; Zárate *et al.*, 2000). Rotavirus interaction with other integrins such as $\alpha \beta 2$ and $\alpha \beta 3$ through VP7 has been demonstrated during post-binding events (Graham *et al.*, 2003; Guerrero *et al.*, 2000; Zárate *et al.*, 2004). Cell surface heat shock cognate protein 70 (Hsc70) has been shown to interact with VP5 and VP6 during rotavirus entry (Jolly *et al.*, 2001; Guerrero *et al.*, 2000; Zárate *et al.*, 2004; Gualtero *et al.*, 2007). VP5* implication in rotavirus entry has been further extended by proposing that this viral protein could assume fusion-inducing conformational changes similar to those characterized in fusion proteins from enveloped viruses, leading to lipid bilayer perforation (Dormitzer *et al.*, 2004; Trask *et al.*, 2010). Rotavirus interaction with cell surface protein disulfide isomerase (PDI) has been suggested based on the sensitivity of rotavirus infection to DTNB [5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)], bacitracin, and anti-PDI antibody treatment (Wolf *et al.*, 2011). However, the identity of the rotavirus cell surface receptor and entry mechanisms continuous to be a controversial issue (Trask *et al.*, 2010; Wolf *et al.*, 2011; Ruiz, 2009; Arias, 2002).

Although the presence of Hsc70 and PDI has been documented in MA104 cells and their implication in rotavirus infection has been suggested by different strategies including the use of synthetic peptides derived from rotavirus proteins (Jolly *et al.*, 2001; Guerrero *et al.*, 2002; Zárate *et al.*, 2003; Calderon *et al.*, 2012) and antibodies against these cellular proteins (Calderon *et al.*, 2012), a study of rotavirus-cell interaction using the entire rotavirus structural proteins will further provide important insights into how rotavirus enters into the host cell. The aim of the present work is to perform an analysis of the interactions between recombinant rotavirus structural proteins VP5*, VP8* and VP6, and cellular proteins Hsc70 and PDI in the context of rotavirus entry. Interactions between viral proteins and cellular proteins were followed by ELISA and SDS-PAGE/ Western blotting analysis of the immunoprecipitated complexes. Our findings confirm the usefulness of re-

combinant proteins in the identification of protein interactions during virus entry into the host cell. We show that addition of recombinant VP6 to MA104 cells led to the inhibition of rotavirus infection, suggesting its participation in the virus entry process. The results also extend the knowledge about rotavirus VP5* and VP6 interaction with the cellular proteins Hsc70 and PDI which have been found to be implicated in virus entry into the host cell.

Materials and methods

Expression of recombinant VP5*, VP8*, Hsc70 and PDI

Recombinant VP5* and VP8* fused with glutathione-transferase (GST) were expressed in *E. coli* BL21(DE3) that had been transfected with pGEX-4T-VP5* and pGEX-4T-VP8* (Pharmacia, Stockholm, Sweden), respectively. Plasmids were kindly donated by Dr. C. F. Arias (Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México - UNAM). VP5* and VP8* are encoded by RRV (G3 P5B [3]) VP4 sequences spanning nucleotides 1 to 750, and 749 to 2347, respectively (Zárate *et al.*, 2000; Isa *et al.*, 1997). Conditions of transfection, expression and purification were previously described (Zhang *et al.*, 2010). The purified VP5*-GST and VP8*-GST in Tris buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM CaCl₂) were treated with thrombin (CleanCleave kit, Sigma, St. Louis, MO, USA) to cleave the GST tag from the fusion protein.

Recombinant Hsc70 and PDI were expressed in *E. coli* BL21(DE3) which had been transfected with pET-28a(+)-Hsc70 or pET-28a(+)-PDI expression vector (kindly donated by Dr. C. F. Arias, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Mexico). A cDNA for human Hsc70 in plasmid pETHSC (GenBank accession No. M11717) (kindly provided by R. T. Morimoto, Northwestern University) containing the complete sequence of Hsc70 protein was subcloned into the pET28 expression vector (Novagene) to generate a fusion protein with a six-histidine tail at its COOH-terminus (Vargas *et al.*, 2006). The rat liver PDI cDNA, taken as a *TthIII-SalI* fragment from pMAL5.1, and kindly donated by Dr. R.T. Raines (Department of Chemistry, University of Wisconsin-Madison) was subcloned into the *NdeI-SalI* sites of pET28a (Novagen) (after blunting the *NdeI* site) to produce a fusion protein with a tail of six histidines at its NH₂-terminus (Edman *et al.*, 1985; Laboissiere *et al.*, 1995).

BL21(DE3) competent *E. coli* cells were prepared as previously described (Chung *et al.*, 1989; Moreno *et al.*, 2013) with some modifications. An *E. coli* colony was resuspended in LB medium and grown overnight at 37 °C with orbital shaking (150 rpm). An aliquot (1 ml) of the culture was inoculated in LB medium (100 ml) to reach an OD_{600 nm} of 0.3 - 0.4 and then centri-

fuged (12000 g) for 10 min to collect the cells which were resuspended in 5 ml of freezing medium [10 % polyethylenglicol (PEG) 3350, 5 % dimethyl sulfoxide (DMSO), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, and 10 % glycerol in 60 % LB medium, pH 6.7 - 7.0] and aliquots were kept on ice for 5 min before being stored in liquid nitrogen. An aliquot was mixed with 10 ng of pET-28a(+)-Hsc70 or pET-28a(+)-PDI expression vector dissolved in 100 ml of a solution containing 100 mM KCl, 30 mM CaCl₂ and 50 mM MgCl₂. The suspension containing bacteria and plasmid DNA was gently agitated and incubated on ice for 20 min before heat shock treatment at 42 °C for 2 min. The transfected bacteria were seeded in LB-agar plates with 50 µg/ml kanamycin and incubated for 14 h at 37 °C.

A colony from bacteria transfected with pET-28a(+)-Hsc70 was inoculated in 25 ml of LB medium containing 50 µg/ml kanamycin and incubated for 12 h at 37 °C with orbital shaking (150 rpm). An aliquot (5 ml) from this culture was inoculated into 500 ml of LB medium supplement with 50 µg/ml kanamycin and 2 % glucose followed by incubation at 37 °C with orbital shaking (150 rpm) until the OD_{600 nm} profile indicated that the exponential growth phase was reached. Isopropyl thiogalactoside (IPTG) (0.5 to 2 mM final concentration) was added to the culture at this growth phase followed by further incubation for 2, 4, 6 or 8 h. In the case of bacteria transfected with pET-28a(+)-PDI, the procedures were as those described for Hsc70 expression vector, except that 2XYT medium was used. Recombinant protein expression was assessed by SDS-PAGE/Western blotting analysis using non-transfected BL21(DE3) cells and transfected BL21(DE3) cells without IPTG treatment as a control. The total protein loaded into each gel well was spectrophotometrically quantified at 280 nm using a BSA standard curve.

Solubilization and purification of recombinant Hsc70 and PDI

Solubilization of rHsc70 and rPDI from BL21(DE3) lysates was performed following the procedure reported (Frangioni *et al.*, 1993) with some modifications. Bacteria were collected by centrifugation at 8000 g for 10 min and washed twice with PBS. Cell pellets were resuspended in 50 ml PBS, treated with 100 µg/ml of lysozyme for 15 min at 4 °C with constant agitation. The suspension was made 5 mM in EDTA, 1% in sodium N-lauroylsarcosine and sonicated for 4 cycles of 15 sec at 20% amplitude before centrifugation at 12000 g for 15 min at 4 °C. Triton X-100 at 1% was added and the presence of rHsc70 and rPDI was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting.

Recombinant proteins were purified using a 10 ml His Trap (BioRad) affinity column. The column was washed with 5 volumes of 50 mM phosphate buffer containing 300 mM NaCl and equilibrated with 5 volumes of the same buffer added with 10 mM imidazole. Cell

lysates were also added with 10 mM imidazole before applying on the column. Following washing with phosphate buffer containing 10 mM imidazole until no protein was detected with Bradford's method, recombinant proteins were eluted from the column using increasing imidazole concentrations (0.25 – 1 M) in phosphate buffer. The column was finally washed with 10 volumes of H₂O and 5 volumes of 30% ethanol.

Expression and purification of recombinant VP6

Recombinant VP6 was expressed in MA104 cells that had been infected with a recombinant vaccinia virus containing the rotavirus SA11 (G3 P5B (Esposito *et al.*, 2011) gene encoding structural VP6 (kindly donated by Dr. M. Franco, Instituto de Genetica, Universidad Javeriana). Recombinant VP6 containing 397 amino acids is encoded by a VP6 sequence spanning nucleotides 1 to 1362 (Tang *et al.*, 1997). Cells were cultured in Eagle Dulbecco's modified medium (DMEM) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS) and 2 mM L-glutamine at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. Cells at 80 – 100% confluence were washed twice with PBS and infected with the recombinant vaccinia virus present in a MA104 cell lysate for 1 h at 37 °C. The remaining cell lysate containing the virus was removed and cells were incubated in Eagle minimal essential medium (MEM) for 24 h at 37 °C.

To identify the subcellular fraction in which VP6 is located, the vaccinia virus-infected cells were frozen and thawed 3 times at – 70 °C, sonicated for 2 cycles of 15 sec at 20% amplitude and centrifuged at 15000 g for 15 min at 4 °C. The soluble fraction (SF) was kept and the insoluble fraction (IF) washed twice with Tris buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM KCl). The IF was treated with 1% Triton X-100 and 8 M urea before SDS-PAGE/Western blotting analysis. Solubilization of VP6 from the previously Tris buffer-washed IF was attempted by resuspension in 1 ml RIPA buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate and 150 mM NaCl 150) and incubation for 1 h at 4 °C before centrifugation at 12000 g for 10 min at 4 °C. The precipitated fraction was treated with 500 µl of Tris buffer containing 1% N-lauroylsarcosine, CHAPS, β-octylglucoside, Triton X-100, Tween 20, Nonidet P40 or sodium deoxycholate. The solubilized pellets were incubated overnight at 4 °C and then centrifuged at 12000 g for 10 min at 4 °C. The remaining pellet was further treated with 500 µl of 8 M urea dissolved in buffer Tris (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 KCl, 1% sodium lauroyl sarcosine). Proteins in each fraction were separated by SDS-PAGE, analyzed by Western blotting and compared with samples from uninfected cells.

Purification of rVP6 was also attempted by a sequential treatment of the IF from recombinant vaccinia virus-infected cell lysates. The IF was sequentially treated with RIPA buffer followed by treatment with 1%

β-octylglucoside, 8 M urea, and 8 M urea plus 1% N-lauroylsarcosine in Tris buffer. The sequential pellets were obtained by centrifugation at 12000 g for 10 min at 4 °C. The different solubilized fractions were analyzed by SDS-PAGE/Western blotting using rabbit polyclonal antibodies against rotavirus particles. The solubilized fractions containing rVP6 were dialyzed against a decreasing gradient of urea in PBS, diluted 10 times in PBS and finally concentrated using Amicon Ultra – 4 (cut-off 10 kD; Millipore, Billerica, MA, USA).

Production of antibodies against rVP6 and rHsc70

Purified rHsc70 or partially purified rVP6 were separated in preparative 12% SDS-PAGE. Proteins in a gel lane were transferred onto a PVDF membrane and rHsc70 or rVP6 were identified by Western blotting using rabbit polyclonal antibodies against either of these proteins, HRP-conjugated secondary goat anti-rabbit antibodies and 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) substrate. Gels were stained with Coomassie blue and the identified proteins bands were excised from gels and destained in methanol-acetic (50% - 12.5%) solution before being equilibrated in PBS. Gel pieces were crushed in PBS and the slurry passed several times through an 18-, 21- and then 23-gauge needle. Three month-old New Zealand rabbits were subcutaneously inoculated in the back with 750 µg of either recombinant protein emulsified in complete Freund's adjuvant. Each rabbit received 3 injections spaced at 20 days intervals. Rabbits were bled 10 days after the final immunization and sera were obtained and mixed (1:1; v/v) with glycerol before storing at – 20 °C.

The antibodies raised against recombinant proteins were characterized by ELISA, immunochemistry and SDS-PAGE/Western blotting. ELISA plates were coated with growing concentrations (2.5 - 20 µg/ml) of rVP6 in PBS, blocked with 1% BSA and reacted with rabbit antibodies against rVP6 diluted (1: 1000) in PBS containing 0.05% Tween 20 and 0.1% BSA. Detection was performed with HRP-conjugated goat anti-rabbit antibodies and AEC in 50 mM Na-acetate buffer, pH 5.0, and 0.04% H₂O₂. Immunocytochemistry analysis was carried out by infecting MA104 cell monolayers in 96-well culture plates with purified trypsin activated RRV triple layered particles (TLPs) (MOI of 0.05). Cells were incubated for 1 h at 37 °C, washed twice with MEM and further incubated in MEM for 12 h at 37 °C. Cells were fixed in ice-cold methanol for 40 min and treated with dilutions (1:250 - 1:2000) of rabbit anti-rVP6 antibodies in PBS for 1 h at 37 °C. HRP-conjugated secondary antibody and AEC substrate in 50 mM Na-acetate buffer, pH 5.0, and 0.04% H₂O₂ were used for developing the reaction. Western blotting analysis of rabbit antibodies to rVP6 and rHsc70 was conducted using as antigen both purified recombinant proteins and cell lysates containing the recombinant proteins. Purified

RRV TLPs (500 ng/well) were also used as antigen to test anti-rVP6 antibodies. Lysates (25 – 100 µg protein/well) from non transfected cell were used as a control. Rabbit antibodies diluted (1:1000) in PBS containing 0.05% Tween 20 and 0.1% skimmed milk were added to membranes. Detection limit for anti-rVP6 serum was determined using dilutions (1:250 – 1:1000) of this serum to detect 250 ng/well of purified rVP6. HRP activity present in the secondary antibody used was visualized as described above for the immunochimistry assay.

Interaction between rotavirus structural proteins and cellular Hsc70 and PDI

Rotavirus structural proteins rVP5*, rVP8* and rVP6 were tested for their interaction with cellular rHsc70 and rPDI. ELISA was performed by coating 96-well plates with 40 µg/ml of rHsc70 or rPDI in PBS at 4 °C overnight and blocking with 1% BSA in PBS at 37 °C for 2 h. After washing with PBS, increasing concentrations (1 – 20 µg/ml) of either rotavirus recombinant protein in the same buffer were added and incubated at 37 °C for 2 h. Wells were washed with PBS before addition of rabbit polyclonal antibodies (1:1000) against rotavirus proteins in blocking buffer and incubation at 37 °C for 2 h. Antibodies against rVP5* y rVP8* were produced in our animal facilities (Zhang *et al.*, 2010). Reaction was detected using HRP-conjugated goat anti-rabbit antibodies and ortho-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) in substrate buffer (25 mM citric acid, 50 mM Na₂HPO₄, pH 5.0, containing 0.03% H₂O₂). For negative controls, 1% BSA was used instead of antibodies or rotaviral and cellular proteins. Data were expressed as mean of two independent experiments performed with duplicate samples. The plate readings were done at 492 nm and the ΔOD values were calculated by subtracting mean values of control samples containing 1% BSA instead of antibodies or rotaviral and cellular recombinant proteins.

Co-immunoprecipitation analysis for interactions between rotavirus proteins and cellular proteins was conducted by incubating equal volumes (100 µl) of 2.5 µg/ml of rVP5*, rVP8* or rVP6 with 10 µg/ml of rHsc70 or rPDI in the presence of 0.1% BSA. Each mix of proteins was maintained at 4 °C overnight prior addition of rabbit polyclonal antibodies (1:200) against rotavirus proteins and incubation for 1 h at 37 °C. BSA (4%)-treated Affi-Gel protein A-agarose (10 µl) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was added to each mix (200 µl) of antibody-treated proteins followed by incubation for 1 h at room temperature, according to the manufacturer's instructions. After incubation at room temperature for 1 h, the resin was washed 3 times with PBS-Tween 20 (0.05%) and collected by centrifugation at 2000 g for 10 min. Protein in the precipitated complex was analyzed by SDS-PAGE/Western blotting using primary anti-Hsc70 or anti-PDI goat polyclonal antibodies fo-

llowed by addition of HRP-conjugated rabbit anti-goat antibodies and AEC substrate. rHsc70 or rPDI were incubated with antibodies against rVP5*, rVP8* or rVP6 and then immunoprecipitated to be used as a control. Conversely, the mix of viral and cellular proteins was immunoprecipitated with goat polyclonal antibodies (1 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) against either Hsc70 or PDI and the Western blotting analysis was performed using rabbit primary antibodies against rVP5*, rVP8* or rVP6. These rotavirus proteins were incubated with antibodies against Hsc70 or PDI and then immunoprecipitated to be used as a control.

Interaction of VP5*, VP6 or VP8* with raft-associated Hsc70

The interaction between rotavirus proteins and Hsc70 in lipid microdomains (rafts) was determined by mixing a MA104 cell suspension (9.2×10^6) (600 µl) with 100 µl of rVP5* (15 µg/ml), rVP8* (15 µg/ml) or rVP6 (1.5 µg/ml) followed by incubation for 1 h at room temperature. The cell viability was assessed using the Tripan blue exclusion test after treatment with recombinant proteins. Cells that had not been treated with rotavirus proteins were used as a control. Cells were washed twice with PBS and incubated with 120 µl of lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM DTT, 1 % Triton X-100, 1 mM PMSF) during 30 min at 4 °C. The lysate was mixed (1:1; v/v) with 80% sucrose in buffer TNC (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl; 1 mM CaCl₂) in a centrifuge tube. A discontinuous sucrose gradient (30 – 5%) in TNC was layered onto the lysate and then centrifuged (Sorvall TST 60.4 at 170000 g for 8 h at 4 °C. The gradient was fractionated and fractions were mixed with β-cyclodextrin (10 mM final concentration) and octylglucoside (0.8% final concentration) and incubated at 37 °C for 1 h. The fractions were incubated with goat polyclonal antibodies against Hsc70 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) at 37 °C for 1 h before addition of 30 µl Affi-Gel protein A-agarose and incubation for 30 min at room temperature. Proteins in the immunoprecipitated fractions were analyzed using Western blotting and the separated proteins detected with rabbit polyclonal antibodies against rVP5*, rVP8* or rVP6.

Infectivity inhibition assay

The effect of rVP5*, VP8* or rVP6 on rotavirus infectivity was assessed by adding either protein (1.2 – 40 µg/ml) to a MA104 cell monolayer in 96-well culture plates and incubating for 1 h at 37 °C. Following the treatment of cells with the recombinant proteins, cell viability was assed using the Tripan blue exclusion test. RRV TLPs (50 µl) containing 5×10^4 FFU/ml were inoculated into cells followed by incubation for 1 h at 37 °C. Cell monolayers were washed with PBS and incu-

bated in MEM for an additional 12 h at 37 °C. Infectivity was determined by fixing cells in ice-cold methanol for 40 min and incubating them with rabbit anti-RRV antibodies (1:1000) in PBS for 1 h at 37 °C. HRP-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) was used at 0.133 µg/ml and developed with AEC substrate. Infectivity was expressed as mean percentage of infected cells.

Results

Expression and purification of rHsc70, rPDI and rVP6

The optimal conditions for expression of pET28a-Hsc70 in *E. coli* BL21(DE3) were determined. These conditions included bacterial concentration (OD at 600 nm) before induction, induction time, and inducer concentration. Induction assays were conducted in bacterial cultures showing OD_{600 nm} values that ranged from 0.1 to 0.7 which encompassed the exponential growth phase and the starting of the stationary growth phase. A typical bacterial growth curve is shown in Fig. 1A. Expression of the rHsc70 was followed by SDS-PAGE and Western blotting analysis using rabbit anti-Hsc70 antibodies and taking into account the expected molecular mass (65 kDa) for this protein. In the absence of IPTG, no expression for rHsc70 was found either in the soluble or in insoluble fraction (Fig. 1B, lanes 2, 3). Addition of IPTG (1 mM final concentration) at OD_{600 nm} 0.1 – 0.4 for 4 h resulted in induction of basal expression of rHsc70 which was detected as a Western blot band present in either the soluble or insoluble fractions (Fig. 1B, lanes 4 – 11). IPTG induction at OD_{600 nm} 0.5 – 0.7 for 4 h led to rHsc70 expression only in the insoluble fraction (Fig. 1B, lanes 13, 15, 17). The highest amount of rHsc70 expression was obtained when the bacterial culture at OD_{600 nm} 0.5 was induced with IPTG (1 mM) for 4 h. In this case, rHsc70 represented 1.02% of the total insoluble protein loaded in SDS-PAGE wells (Fig. 1B, lane 13).

Recombinant Hsc70 was found in both the soluble and insoluble fractions when cultures were induced with IPTG at concentrations that ranged from 0.5 to 2 mM (Fig. 1C, lanes 4 – 9) when the culture was induced at OD_{600 nm} 0.5. However, a higher proportion of rHsc70 was always observed in the lysate insoluble fraction from cultures irrespective of the IPTG concentration used (Fig. 1C, lanes 5, 7, 9). Cultures induced with 1 - 2 mM IPTG showed the highest total accumulation of rHsc70 (1.15%) relative to the total protein content in both fractions (Fig. 1C, lane 6 and 7). Variations in the IPTG concentration produced slight changes in the rate of rHsc70 accumulation and its location. In order to increase the rHsc70 accumulation and its location in the soluble fraction, the induction time effect was assessed between 2 and 8 h by treating the culture at

OD_{600 nm} 0.5 with 1 mM IPTG. The recombinant protein was identified in all lysate fractions from cells induced during the times indicated (Fig. 1D, lanes 4 - 11), but a higher accumulation of rHsc70 continued to be observed in the insoluble fraction. However, the highest rHsc70 accumulation (1.39%) was detected in the insoluble fraction relative to the total protein present in both lysate fractions when induction with 1 mM IPTG was initiated at OD_{600 nm} 0.5 and maintained during 4 at 37 °C. The rHsc70 contained in the insoluble fraction was solubilized by treatment with PBS containing N-lauroylsarcosine and DTT but without EDTA to avoid Ni²⁺ chelating which interferes with rHsc70 binding to the resin during its purification. Additional treatment with 1% Triton X-100 was performed for refolding the recombinant protein and reducing nonspecific interaction between bacterial proteins and the resin used for rHsc70 purification.

The rHsc70 was efficiently purified as demonstrated by the comparison of the electrophoretic profiles corresponding to the proteins present in the total lysate and the eluted fractions from the resin (Fig. 1E, lanes 2, 3). The analysis of fractions eluted from the resin with an imidazole gradient is shown in figure 1E (lanes 6 – 12). Fractions analyzed in lanes 8, 9 and 10 show the presence of some non-specific protein bands located both in the high and low molecular weight region. Western blotting analysis using rabbit polyclonal antibodies (1:1000) against Hsc70 showed that these antibodies specifically recognized the purified rHsc70 at amounts as low as 62.5 ng/well (Fig. 1F, lane 6), whereas rHsc70 was detected in cell lysates only when samples contained at least 50 µg/well of total protein (Fig. 1G).

PDI expression was efficiently induced with 0.5 mM IPTG during 4 h at 37 °C. The SDS-PAGE/Western blotting analysis of lysates from the induced cells showed a 55 kDa protein band which was identified as being PDI (Fig. 2A, lanes 4, 5). The PDI purification was carried out by treating cell lysates with PBS containing DTT and sodium N-lauroylsarcosine before passing them through a Ni²⁺ column. The profile of the fractions eluted with the imidazole gradient (0.25 – 1 M) is shown in Fig. 2B. The highest amount of PDI eluted with 250 mM imidazole although some non-specific protein bands showing higher and lower molecular weight than PDI were observed (Fig. 2B, lanes 4, 5). Lower amounts of PDI were obtained at higher imidazole concentrations (Fig. 2B, lanes 6 - 11).

Recombinant VP6 was expressed in MA104 cells after the infection with a recombinant vaccinia virus vector. The Western blotting analysis indicated that a protein band of 39 kDa corresponding to rVP6 was identified predominantly in the IF from the vaccinia virus-infected cell lysates (V-IL) (Fig. 3A, lane 5). Less rVP6 accumulation was detected in the soluble fraction (Fig. 3A, lane 4). This protein band was absent from non-infected cell lysates (N-IL) (Fig. 3A, lanes 6 and 7). Solubilization of

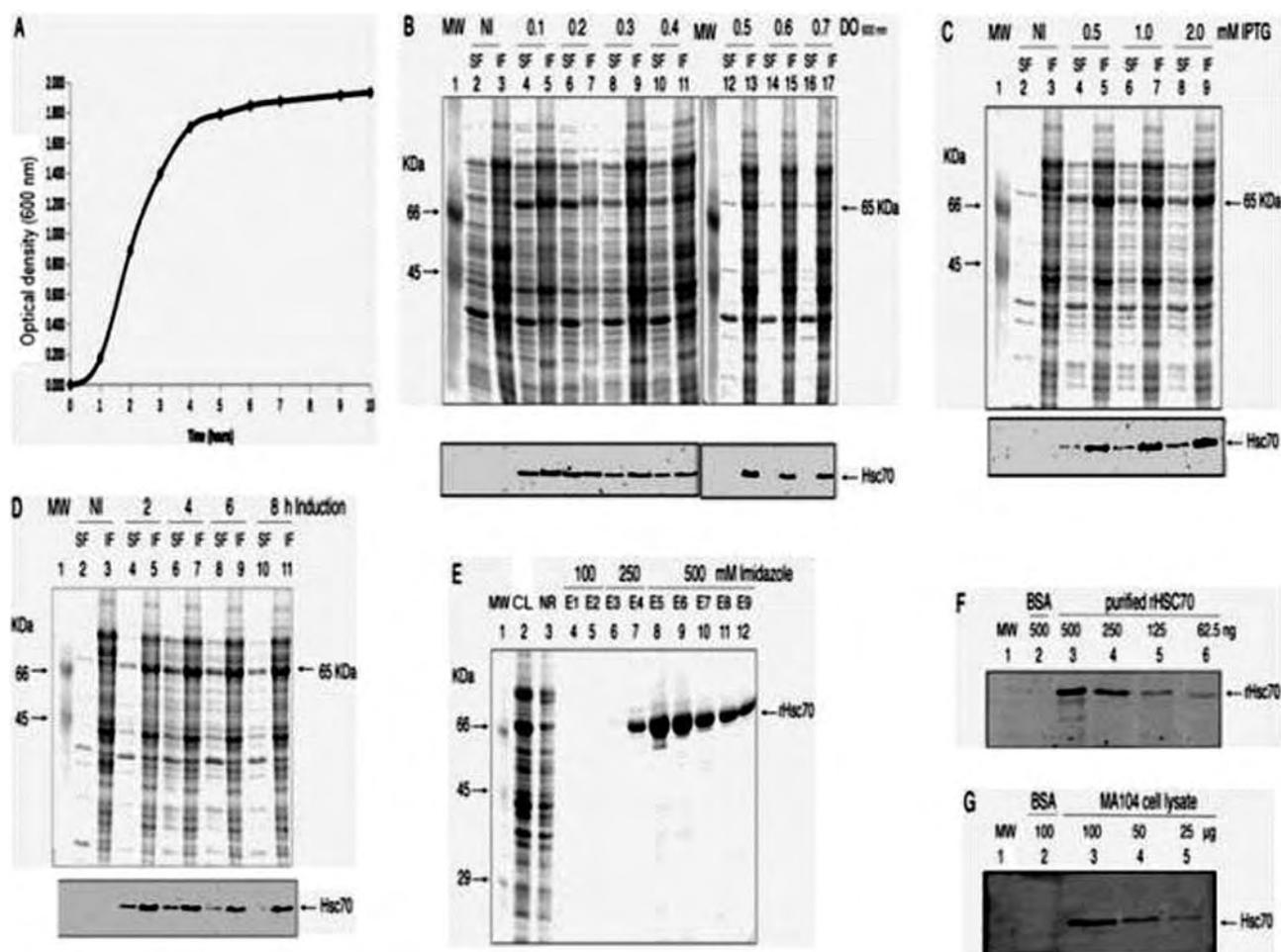


Figure 1. The optimal conditions for expression of recombinant Hsc70 in *E. coli* BL21(DE3). (A) Growth curve of *E. coli* BL21(DE3) transfected with pET-28a(+)-Hsc70 was determined in 2XYT medium by turbidimetry measurements at 600 nm. (B) Expression of rHsc70 was analyzed in both soluble (SF) and insoluble (IF) fractions by SDS-PAGE/Western blotting using primary rabbit antibodies against Hsc70. Proteins were stained with Coomassie blue. The anti-Hsc70 reaction is shown in the lower panel blot. Protein expression was determined following IPTG (1 mM) induction at the cell density (OD 600 nm) values indicated at the top of the upper panel. Non-induced (NI) cells were used as a control. Molecular weight markers (MW) are indicated. (C) Expression of rHsc70 in SF and IF was analyzed by SDS-PAGE/Western blotting after induction with the different concentrations of IPTG indicated at the top of the upper panel. Detection was performed using a primary rabbit antibody against Hsc70 as shown in the lower panel blot. (D) Expression of rHsc70 was analyzed by SDS-PAGE/Western blotting of SF and IF following the times (h) of IPTG (1 mM) induction indicated at the top of the upper panel. Detection was performed using a primary rabbit antibody against Hsc70. Anti-Hsc70 reaction is shown in the lower panel blot. (E) Purification of rHsc70 was carried out using a HisTrap (BioRad) affinity column followed by elution with an imidazole gradient at the concentrations indicated. Fractions eluted (E) from the column were analyzed by SDS-PAGE. Total lysate (CL) and non-retained (NR) fraction were used as a control. (F) Characterization of rabbit polyclonal antibodies against recombinant Hsc70. Different amounts (ng/well) of purified rHsc70 were analyzed in SDS-PAGE and then transferred to PVDF membranes. Purified rHsc70 was detected with primary rabbit polyclonal antibodies against Hsc70 (1:1000). BSA was used as a control. (G) Different amounts (μ g/well) of protein from MA104 cell lysates were separated by SDS-PAGE and then transferred to a PVDF membrane. Hsc70 was detected with primary rabbit polyclonal antibodies (1:1000) against Hsc70. BSA was used as a control.

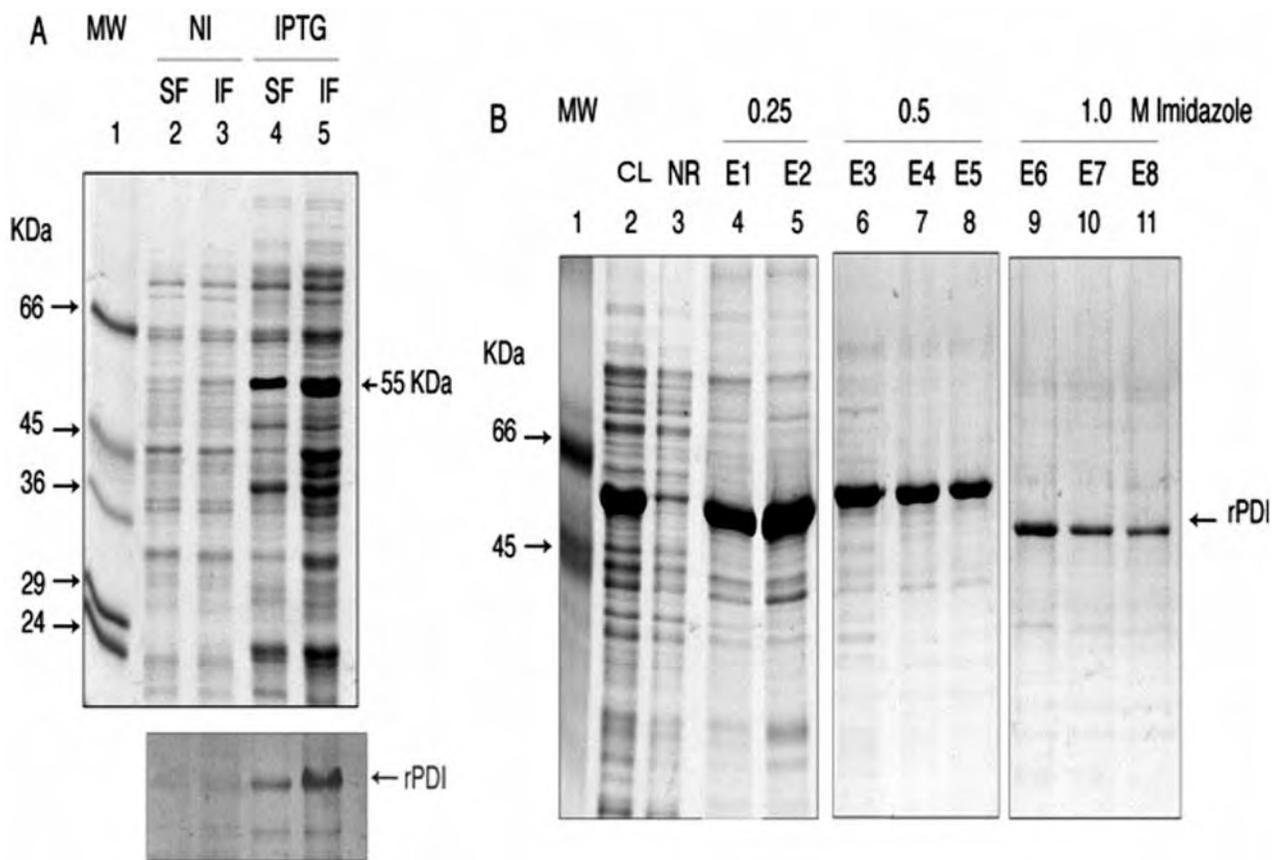


Figure 2. Expression of recombinant PDI in *E. coli* BL21(DE3). (A) Expression of rPDI in *E. coli* cultures induced and non-induced (NI) with IPTG (1 mM) was analyzed in both soluble (SF) and insoluble (IF) fractions by SDS-PAGE/Western blotting. Proteins in the gel were stained with Coomassie blue (upper panel) and PDI was detected using primary rabbit antibodies against PDI (lower panel). (B) Purification of rPDI was carried out using a HisTrap (BioRad) affinity column followed by elution with an imidazole gradient at the concentrations indicated. Eluted fractions (E) were analyzed by SDS-PAGE/Western blotting using primary rabbit anti-PDI antibodies. Total lysate (CL) and non-retained (NR) fraction were used as a control.

rVP6 from the IF was attempted by treatment with RIPA buffer followed by the recovery of a secondary insoluble fraction which was further treated with 1% sodium N-lauroylsarcosine, CHAPS, β -octylglucoside, Triton X-100, Tween 20, Nonidet P40 or sodium deoxycholate. The treatment of the remaining pellets from these detergent treatments with 8 M urea in Tris buffer showed that, despite some contaminant proteins, all the urea-solubilized fractions were enriched in rVP6 (Fig. 3B). In order to eliminate additional contaminant proteins, the standard procedure for rVP6 purification started with RIPA treatment to solubilize some contaminant proteins from the cell lysate insoluble fraction (IF) (Fig. 3C, lane 3), followed by treatment of the resultant pellet with 1% β -octylglucoside (Fig. 3C, lane 4). Then, the remaining pellet was treated with 8 M urea (Fig. 3C, lane 5) and finally with 8 M urea plus 1% sodium N-lauroylsarcosine (Fig. 3C, lane 6). Urea treatment of the IF in the absence of other treatments

(Fig. 3C, lane 2) showed that the previous detergent treatments of the IF contributed to decrease contaminant proteins. The solubilized VP6 was dialyzed against PBS and concentrated by ultrafiltration (Amicon Ultra 4, Millipore).

Characterización of antibodies against VP6 and Hsc70

Western blotting analysis of anti-VP6 antibodies showed that these antibodies recognized the corresponding viral antigen in lysates from vaccinia virus-infected cells expressing recombinant VP6 when gel wells were loaded with 25 - 100 μ g of total protein (Fig. 4A, lanes 3 - 5). Purified rVP6 (500 - 62.5 ng/well) was also recognized in this analysis (Fig. 4B, lanes 3 - 6). However, a positive reaction corresponding to a lower molecular weight band was seen which could be explained in terms of a degradation product from rVP6

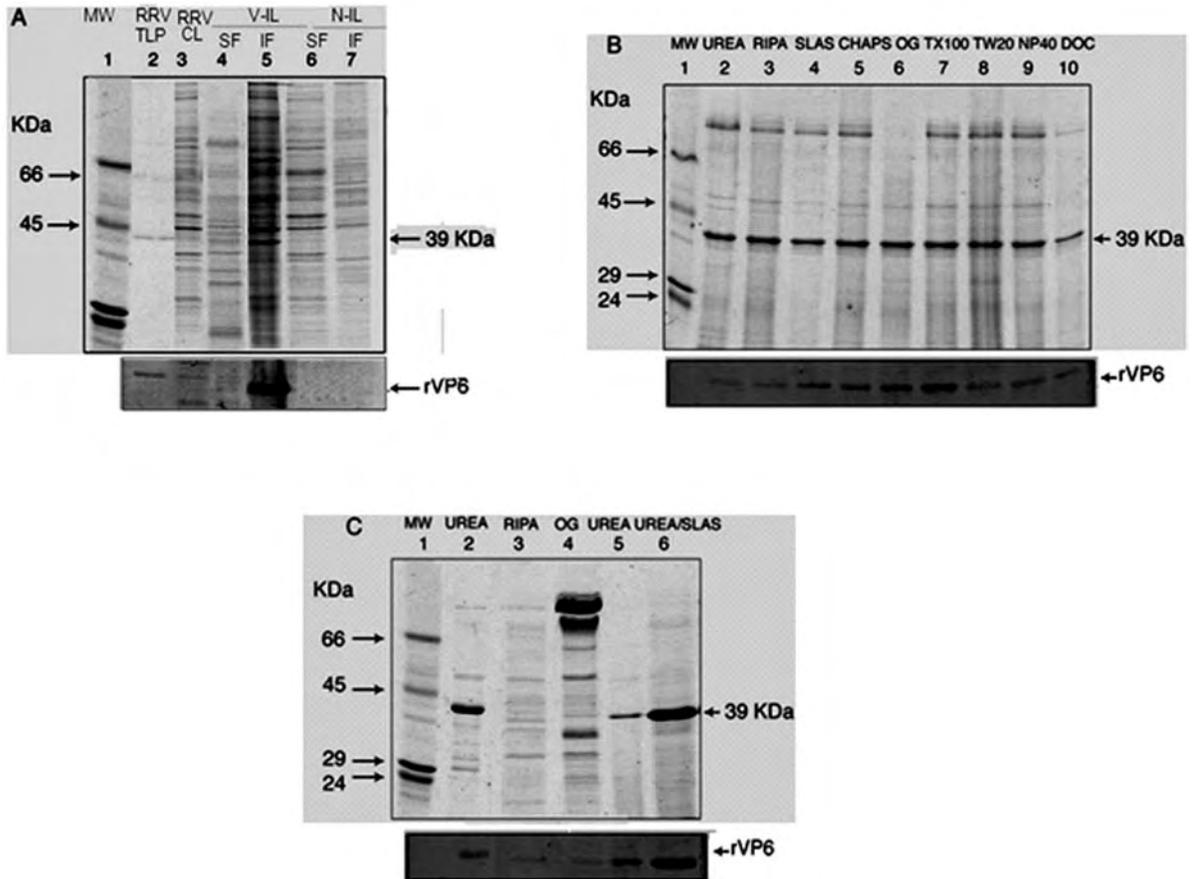


Figure 3. Expression of recombinant VP6 in MA104 cells. (A) Cell monolayers were infected with a recombinant vaccinia virus containing a SA11 nucleotide sequence encoding VP6. Soluble (SF) or insoluble (IF) fractions of lysates from both vaccinia-infected (V-IL) and RRV infected (RRV-IL) MA104 cells were analyzed by SDS-PAGE/Western blotting. The membrane shown in the lower panel was reacted with rabbit polyclonal antibodies against RRV particles. Purified RRV TLPs, total RRV-infected cell lysate (RRV CL) and total non-infected cell lysates (N-IL) were used as a control. Molecular weight markers (MW) are indicated. Insoluble fractions (IF) (lanes 5 and 7) were solubilized by treatment with 8 M urea before analysis. (B) Insoluble fractions (IF) from recombinant vaccinia virus-infected cell lysates were solubilized in RIPA buffer or in Tris buffer containing the indicated detergents at 1%. SLAS: Sodium N-Lauroylsarcosine; OG: Octyl β -D-glucopyranoside; TX100: Triton X-100; TW20: Tween 20; NP40: Nonidet P-40; DOC: Sodium deoxycholate. Molecular weight markers (MW) are indicated. The solubilized proteins were submitted to SDS-PAGE/Western blotting analysis. Proteins in the gel were stained with Coomassie blue (upper panel) and rotavirus proteins detected using rabbit polyclonal antibodies against RRV particles (lower panel). (C) Insoluble fractions (IF) from recombinant vaccinia virus-infected cell lysates were sequentially treated with RIPA buffer, β -octylglucoside, and 8 M urea plus N-lauroylsarcosine. The different solubilized fractions were analyzed by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. The arrow indicates the purified VP6. Total SF and IF from cell lysates (CL) were used as a control. Molecular weight markers (MW). IF solubilized with 8 M urea (lane 2); IF solubilized with RIPA at 4 °C for 4 h (lane 3); Remaining pellet from the previous treatment that was solubilized with OG at 1% (lane 4); Remaining pellet from the previous treatment that was solubilized with 8 M urea (lane 5); Remaining pellet from the previous treatment that was solubilized with urea plus SLAS at 1% (lane 6).

(Fig.4A and B, lanes 3 and 4). Partially purified rVP6 (250 ng) was detected by the highest dilution (1:3000) of the antiserum against rVP6 (Fig. 4C, lanes 2 - 5). VP6 from purified TLPs (500 ng/well) was also detected by Western blotting using anti-VP6 antibodies at dilutions ranging from 1:250 to 1:1000 (Fig. 4D, lanes 4 - 6). ELISA showed increasing absorbance values for samples containing rVP6 (2.5 - 20 μ g/ml) (Fig. 4E). Anti-VP6 antibodies at a dilution of 1:2000 showed to be useful for detecting RRV TLP-infected MA104 cells

that had been inoculated with a MOI of 0.8 since more than 50% of cells were found to be positive to the viral antigen as detected by the immunocytochemistry assay (Data not shown).

***In vitro* interaction of VP5*, VP8* and VP6 with Hsc70 and PDI**

To assess the interaction between rotaviral proteins (VP5*, VP8* or VP6) and cellular proteins (Hsc70 or

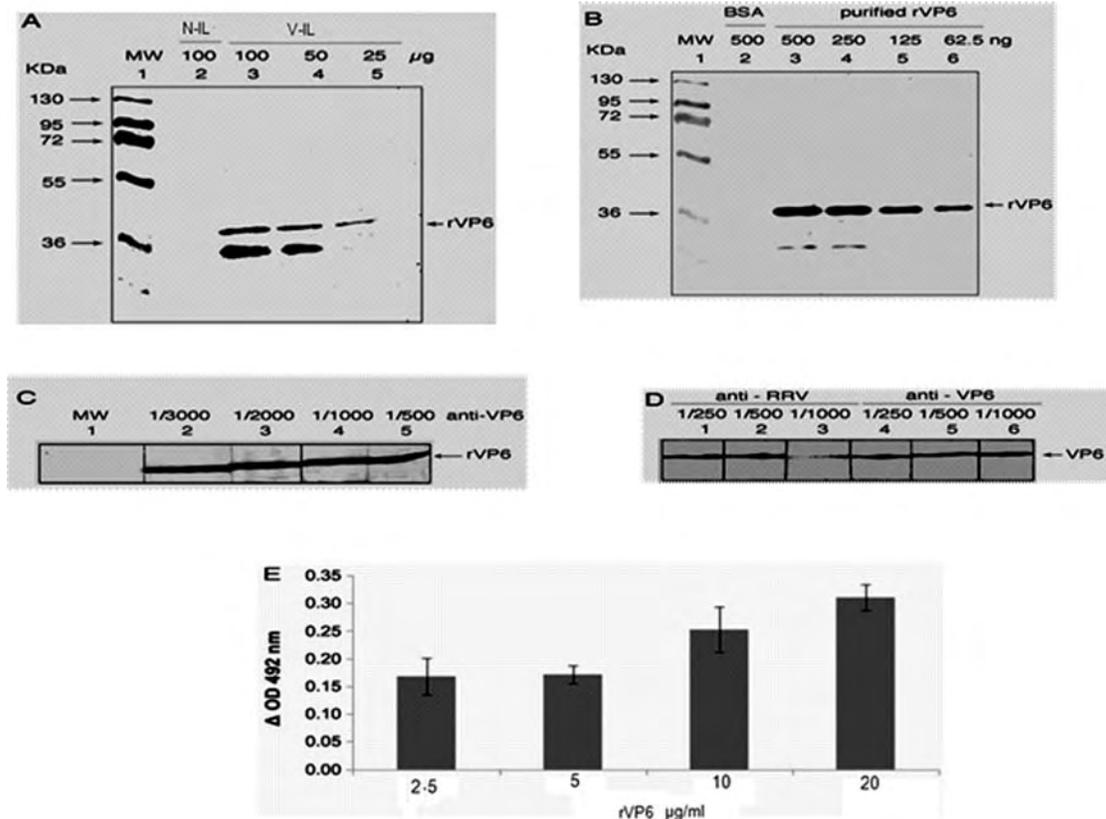


Figure 4. Characterization of rabbit polyclonal antibodies against recombinant VP6. (A) Different amounts ($\mu\text{g}/\text{well}$) of lysate protein from vaccinia virus infected-cells expressing recombinant VP6 were separated by SDS-PAGE and then transferred to a PVDF membrane. Non-infected cell lysates were used as a control (N-I-L). rVP6 was detected with primary rabbit polyclonal antibodies against VP6 (1:1000). (B) Different amounts (ng/well) of purified rVP6 were analyzed in SDS-PAGE and then transferred to PVDF membranes. Purified rVP6 was detected with primary rabbit polyclonal antibodies against VP6 (1:1000). (C) rVP6 (250 ng/well) were analyzed in Western blotting. Membranes were probed with decreasing dilutions of rabbit polyclonal antibodies against VP6. (D) TLP proteins (500 ng) were separated in SDS-PAGE and then transferred to PVDF membranes. Proteins were detected with increasing dilutions of rabbit polyclonal antibodies against VP6 or rabbit anti-RRV TLP antibodies used as a control. (E) ELISA plates were coated with increasing amounts ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of rVP6 and were detected with primary rabbit polyclonal antibodies against VP6 (1:1000) and HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody.

PDI), ELISA plates were coated with either of the latter proteins (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and reacted with either rotaviral proteins at the concentrations indicated. Absorbance values showed an increasing profile which was directly proportional to the growing rVP5* concentrations (1 – 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) added to rHsc70 coated wells (Fig. 5A). A similar interaction profile was observed when rHsc70 coated wells were reacted with increasing rVP6 concentrations (0.078 – 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Fig. 5B). These findings suggest that viral rVP5* and rVP6 interact with Hsc70 at least in the *in vitro* conditions used. When rPDI coated ELISA wells were reacted with increasing rVP5* concentrations (1.25 – 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and also with different rVP6 concentrations (0.156 – 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), a positive linear correlation with the absorbance values was found (Fig. 5D and 5E). Although absorbance values were relatively low mainly for VP5* (less than 0.2), these results suggest that rVP5* and rVP6 are directly interacting with PDI *in vitro*. ELISA results for rVP8* in-

teractions with Hsc70 or PDI were negative (Fig. 5C and 5F).

An immunoprecipitation assay was conducted to confirm the interactions found by ELISA. rPDI or rHsc70 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were separately incubated with either rVP6 (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), rVP5* or rVP8* (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Immunoprecipitation was performed using specific antibodies against either cellular protein. Western blotting analysis of the immunoprecipitated proteins showed the presence of recombinant viral proteins rVP5* and rVP6 which were detected with the respective polyclonal antibodies (Fig. 5G and 5H). The immunoprecipitation results were not conclusive for VP8* since its molecular weight was shared with that of immunoglobulin heavy chains which were recognized by the secondary antibody used in this assay (Fig. 5I).

Reciprocal immunoprecipitation of the viral and cellular protein mix was also conducted using antibodies

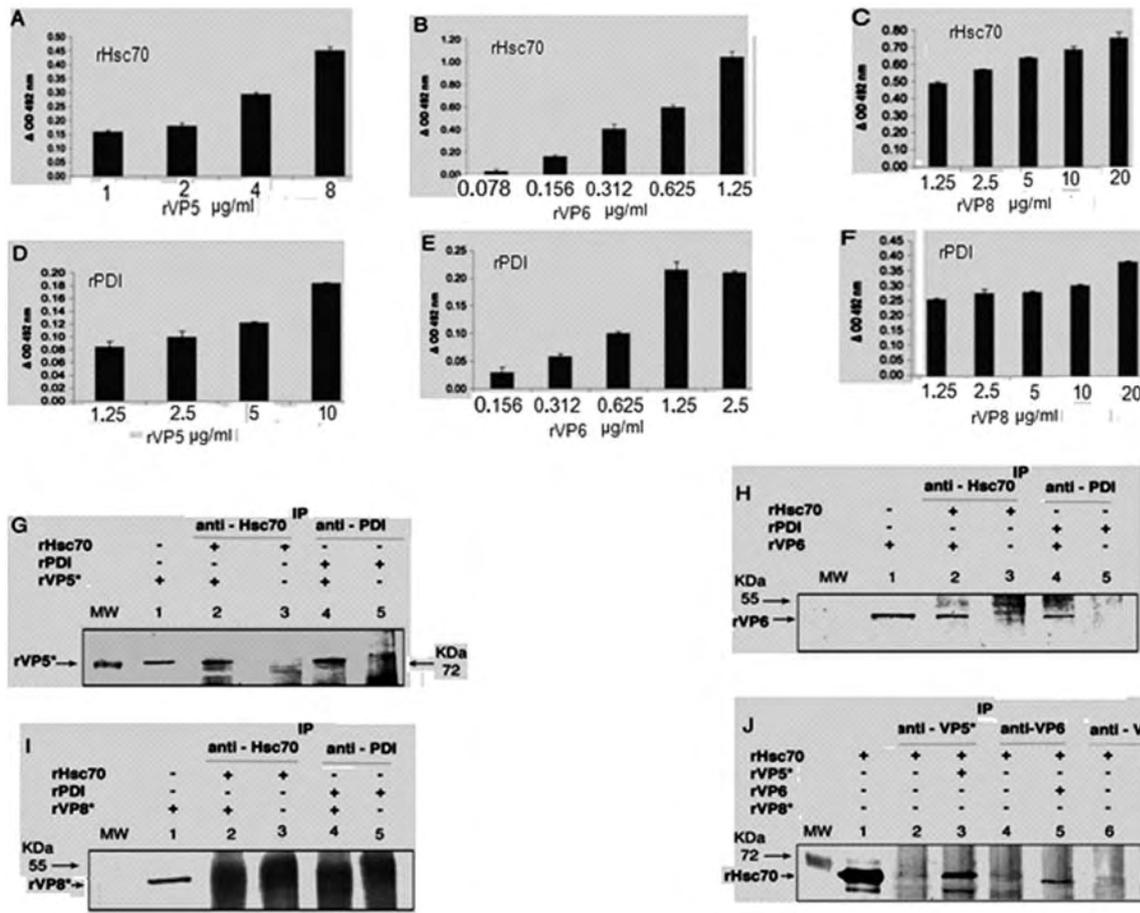


Figure 5. Interaction between rotavirus structural proteins and Hsc70 and PDI. ELISA plates were coated with 40 µg/ml Hsc70 (A, B, C) or PDI (D, E, F) and then reacted with rVP5* (A and D), rVP6 (B and E) or rVP8* (C and F). Plate wells without cellular proteins, viral proteins or primary antibodies were used as controls. BSA instead of cellular or viral proteins was also used as a control. Values were expressed as ΔOD 492 nm, calculated as the difference between mean OD values from experiments and those from negative controls (A, B, D and E). VP6 (2.5 µg/ml) or VP5* or VP8* (10 µg/ml) were separately incubated with Hsc70 or PDI (10 µg/ml) and then co-immunoprecipitated and analyzed by SDS-PAGE/Western blotting. Proteins were co-immunoprecipitated with anti-Hsc70 or anti-PDI antibodies and the co-immunoprecipitated protein (IP) identified with anti-rVP5* (G), anti-rVP6 (H) or anti-rVP8* antibodies (I). (J) Co-immunoprecipitation was performed with antibodies against the viral proteins and identification of the co-immunoprecipitated protein was identified with antibodies against Hsc70.

specifically directed against viral proteins. As shown in Fig. 5J (lanes 3 and 5), Hsc70 co-immunoprecipitated with rVP5* and rVP6 but no with rVP8* (lanes 7). Hsc70 was not bound to the immunoprecipitation resin in the absence of viral protein addition (Fig. 5J, lanes 2, 4 and 6). These results confirm the interaction between viral proteins (VP5* and VP6) and cellular proteins Hsc70 and PDI. In the absence of antibody addition, no viral proteins were bound to the resin used in the immunoprecipitation assay (Data not shown).

Interactions between cell surface Hsc70 and viral proteins rVP5*, rVP8* and rVP6

To test interactions between viral proteins and Hsc70, MA104 cell monolayer were separately incubated with

rVP5*, rVP8* (15µg/ml) or rVP6 (1.5 µg/ml). Cells were lysed with Triton X-100 at 4 °C and the lipid microdomains (rafts) fractionated by centrifugation through a sucrose gradient. After treatment of gradient fractions with β-cyclodextrin and β-octylglucoside, fractions were immunoprecipitated with antibodies against Hsc70 and analyzed by SDS-PAGE/Western blotting. Viral proteins were detected with specific antibodies against them. Cellular proteins Hsc70 (Fig. 6A, upper panel), PDI (Fig. 6A, middle panel) and integrin β3 (Fig. 6A, lower panel) were detected in lipid raft fractions from control cells that had not been treated with viral proteins. These cellular proteins have previously been found to be associated in rafts from MA104 cells and also involved in rotavirus infection (Calderon *et al.*, 2012). It was also found that viral proteins VP5* and

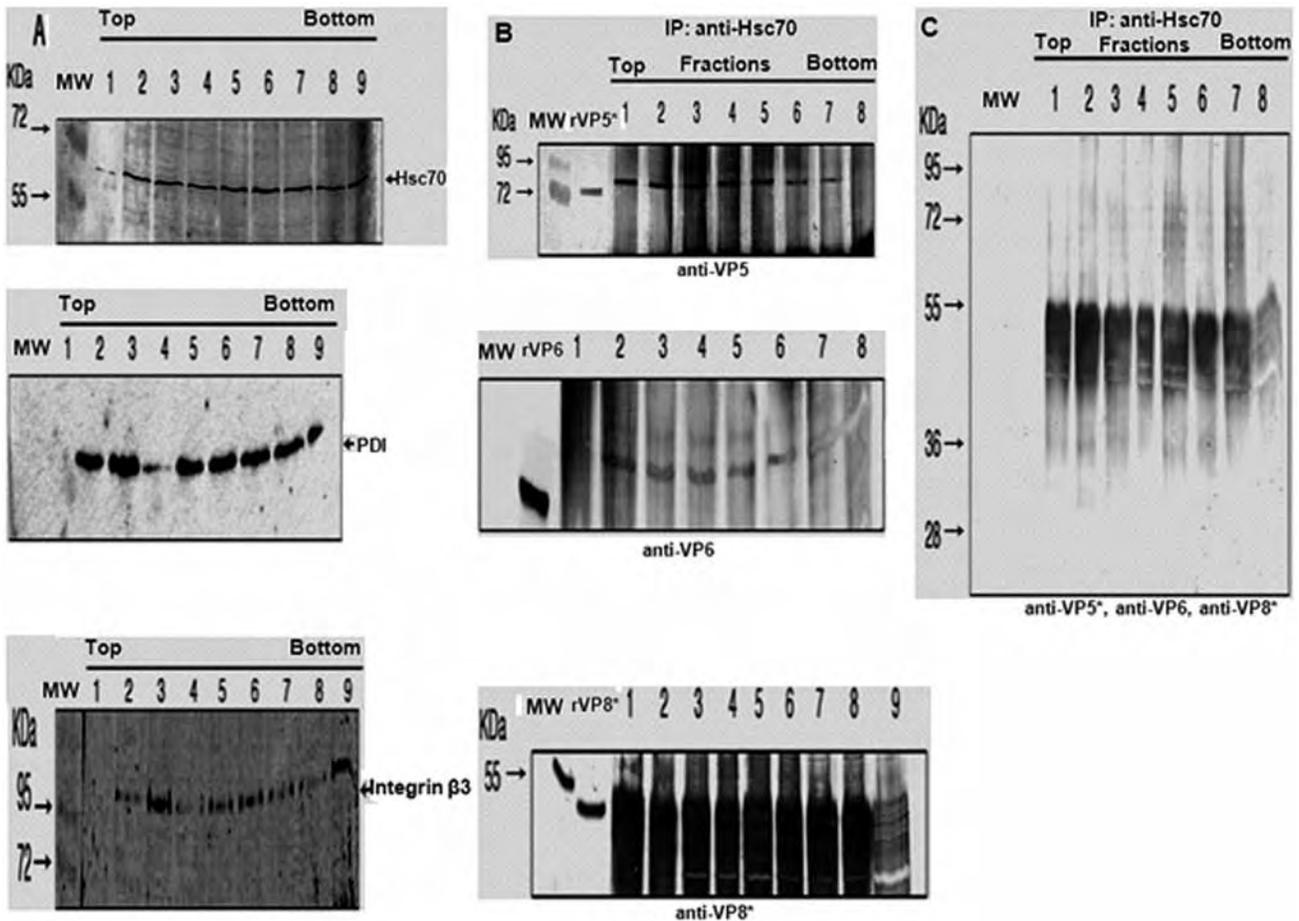


Figure 6. Identification of Hsc70, integrin β 3 and PDI in lipid microdomains (rafts) and the interaction between raft-associated Hsc70 and recombinant viral proteins rVP5*, rVP6 and rVP8*. MA104 cell monolayers were lysed at 4 °C and centrifuged at 38000 γ in a sucrose gradient (30 - 5 %) for 8 h at 4 °C. The sucrose gradient fractions containing rafts were analyzed by SDS-PAGE/Western blotting. (A) Cellular proteins were identified using polyclonal antibodies against Hsc70 (upper panel), PDI (middle panel) or integrin β 3 (lower panel). (B) MA104 cell monolayers were incubated with viral proteins rVP5* (15 μ g/ml), rVP6* (15 μ g/ml) or rVP6 (1.5 μ g/ml) and the raft-containing sucrose gradient fractions were treated with 10 mM β -cyclodextrin and 1% octylglucoside before being immunoprecipitated with rabbit polyclonal antibodies against Hsc70. The co-immunoprecipitated protein (IP) was analyzed by SDS-PAGE/Western blotting and viral protein identified with HRP-conjugated goat anti-rabbit antibodies (2 ng/ μ l) against rVP5*, rVP6 and rVP8*. (C) Cells without addition of viral proteins were used as a control. Cells were processed as indicated in (B), except that blots were reacted with a mix of antibodies against VP5*, VP8* and VP6.

VP6 co-immunoprecipitated with cellular Hsc70. These results show that rVP5* (Fig. 6B, upper panel) and rVP6 (Fig. 6B, middle panel) were located in lipid rafts interacting directly or indirectly with Hsc70. Again, identification of rVP8* resulted difficult as its molecular weight was similar to that from antibody heavy chains which reacted with the secondary antibody used (Fig. 6B, lower panel). Gradient fractions from cells that had not been treated with viral proteins, were not reactive with antibodies against VP5* or VP6 after immunoprecipitation with anti-Hsc70 antibodies (Fig. 6C). This result excludes any non-specific reaction of antibodies against viral proteins.

Inhibitory effect of VP5*, VP8* or VP6 on RRV infection of MA104 cells

Previous work showed that MA104 cell infection with RRV TLPs was inhibited by treatment of cells with DLPs (double layered particles) (Dormitzer 2004). This suggested that VP6 located on the surface of DLPs is involved in rotavirus penetration to host cell. In order to confirm this hypothesis, MA104 cell were incubated with viral proteins rVP5*, rVP8* or rVP6 for 1 h at 37 °C and then infected with RRV TLPs. Immunochimistry detection after 12 h infection showed that infection was decreased by more than 90% when cells were previously incubated with rVP6 (0.5 μ g/ml) (Fig.

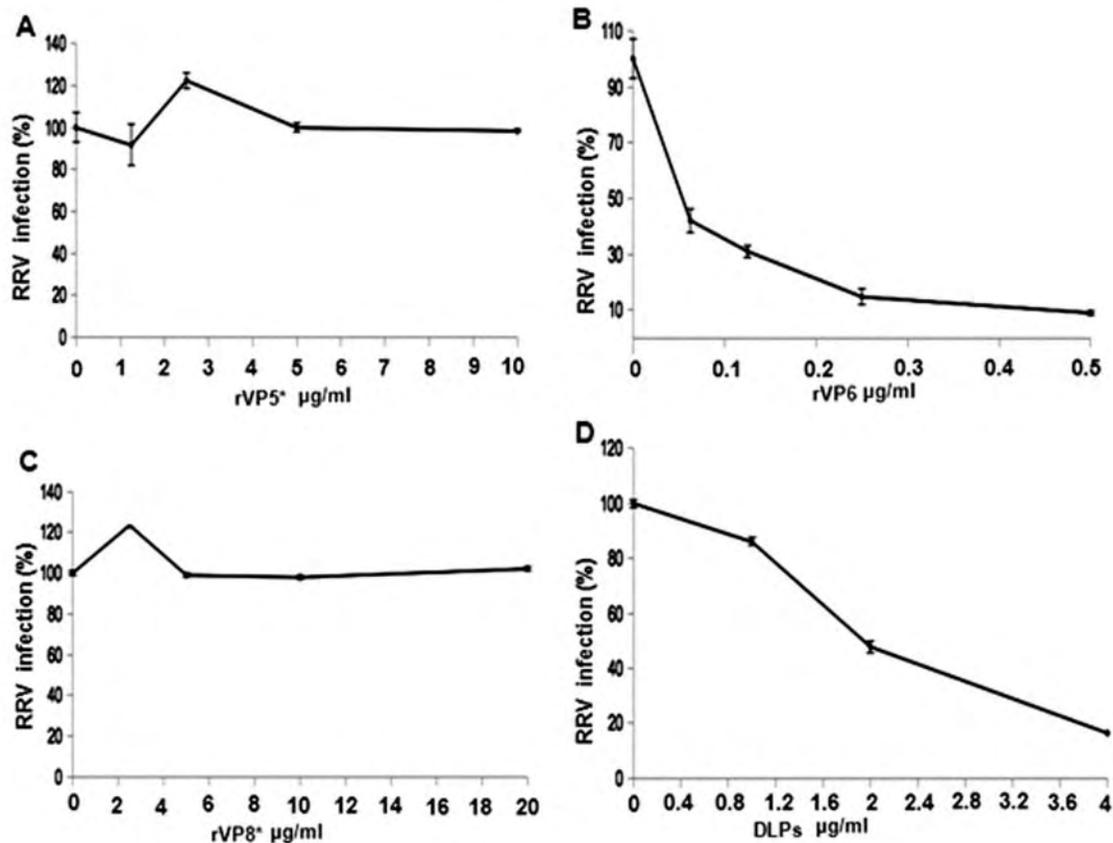


Figure 7. Effect of rVP5*, rVP8*, rVP6 and DLPs on RRV infection. MA104 cells were incubated with different concentrations of viral proteins rVP5* (A), rVP6 (B), rVP8* (C) or DLPs (D) for 1 h at 37 °C. After, the cell monolayers was inoculated with RRV (1 MOI) for 1 h at 37 °C and the incubation was maintained for 12 h at 37 °C. Immunocytochemistry analysis was carried out using polyclonal antibodies against RRV particles. Virus infectivity was determined as mean percentage of infected cells relative to the control untreated cells. Cell viability was determined with the Trypan blue exclusion test and the concentrations of viral proteins used were measured at 280 nm against a BSA calibration curve. The mean percentage of infection for untreated cells was normalized to 100%.

7B). rVP5* or rVP8* treatment of cells was unable to interfere with virus infection even at much higher concentrations than those used for rVP6 (Fig. 7A and 7C). Increasing DLP concentrations led to inhibition of virus infection when cells were DLP-treated before TLP infection (Fig. 7D). Trypan blue exclusion assay showed that cell viability was not affected by DLP treatment. These results confirm the implication of VP6 in the rotavirus infection process in MA1|04 cells.

Discussion

Protein expression in heterologous systems has been a widely used strategy for investigating the molecular mechanisms underlying protein interactions. Expression vectors have been very useful in allowing uptake of genetic foreign material followed by its transcription and translation in heterologous systems (Sorensen *et al.*, 2005; Sahdev *et al.*, 2008). However, proteins

expressed in heterologous systems usually are accumulated forming insoluble inclusion bodies and their solubilization requires detergent treatments and procedures aimed at their *in vitro* refolding (Sahdev *et al.*, 2008). Insolubilization of VP5* and VP8* in heterologous environments has been shown to depend on the expression systems used (Frangioni *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 1997). In the present study, the conditions for expression of recombinant Hsc70 and PDI were compared in terms of bacterial concentration at the time of induction, time of induction and inducer concentration. Therefore, the optimum conditions for expression of the cellular proteins Hsc70 and PDI were established in an *E. coli* system. Optimum conditions for vaccinia virus expressing recombinant VP6 in the MA104 cell system were also defined. The urea and detergents assayed for solubilization of recombinant proteins in combination with the 6-his-tagged expression of Hsc70 and PDI allowed their efficient purifica-

tion after using His Trap affinity columns. On the other hand, the specificity of the rabbit antibodies raised against recombinant Hsc70 and VP6 was demonstrated by Western blotting analysis.

The mechanisms associated with the rotavirus entry into the host cell continue to be a very controversial subject. The high level of purity of the recombinant proteins obtained from the expression and purification procedures described in the present work allowed their use to gain further insight into rotavirus-cell interaction mechanisms. It had been previously shown that RRV DLPs were able to interfere with rotavirus infection in MA104 cells (Gualtero *et al.*, 2007). This finding suggested that VP6 might be involved in rotavirus entry. The results shown here indicated that addition of rVP6 to MA104 cells resulted in more than 90% inhibition of virus infection. This new result gives further support to the hypothesis that this most abundant rotavirus structural protein could be implicated in rotavirus entry. Llama-derived single-chain antibody fragments directed to rotavirus VP6 have been found to possess broad neutralizing activity both *in vitro* and *in vivo* against rotavirus infection (Garaicoechea *et al.*, 2008). The inhibition of rotavirus infection by either DLPs or VP6 could be explained by their binding to cell surface Hsc70 since this protein was found to interact with free or DLP-associated VP6 in ELISA (Gualtero *et al.*, 2007) or co-immunoprecipitation assay. Differential binding strength of Hsc70 to TLPs and DLPs has been previously reported (Guerrero *et al.*, 2002). This finding could be explained by the apparent existence of two exposed Hsc70 binding sites in TLPs which are represented by the VP5* domains 642-658 (Zárate *et al.*, 2003) and 531-554 (Gualtero *et al.*, 2007). In contrast, the DLP-associated VP6 seems to have less Hsc70 binding sites (Gualtero *et al.*, 2007).

Hsc70 has been shown to interact with VP5* and DLPs in previous inhibition and competition studies (Guerrero *et al.*, 2000; Zárate *et al.*, 2004; Gualtero *et al.*, 2007), and cell surface PDI has been found to be needed for rotavirus infection as thiol/disulfide inhibitors and antibodies to PDI interfere with virus infection (Calderon *et al.*, 2012). In the present work, ELISA and co-immunoprecipitation analysis led to concluded that Hsc70 or PDI certainly interact physically with VP5* and VP6. The inhibitory binding of VP6 to Hsc70 following incubation of VP6 with MA104 cells, as evidenced in the co-immunoprecipitation assay, suggests that VP6 binds to Hsc70 during the infectious process which results in a competition for rotavirus binding to cell surface Hsc70. Similarly, these interactions were also found in raft-associated Hsc70 or PDI, although whether these interactions are direct or are mediated by an intermediary protein remains to be established. We propose that rotavirus entry involves the cell surface PDI reducing activity which probably generates thiol groups in VP5* and/or VP6 that contribute either to virion disassembly or priming of viral

proteins to interact with other cell surface receptors. The endoplasmic reticulum (ER)-associated oxidant PDI has been reported to interact with VP7 to generate the disulfide bridges which are needed for the proper VP7 folding during its assembly in TLPs (Svensson *et al.*, 1994; Maruri-Avidal *et al.*, 2008). Despite VP8* and immunoglobulin heavy chains could not be resolved by Western blotting analysis, and interaction between VP8* and Hsc70 or PDI remains to be elucidated. The treatment of MA104 cells with VP5* or VP8* did not affect rotavirus infection. This finding would suggest that the binding of these proteins to the cell surface is dependent of conformational changes that are only produced when these proteins are associated to viral particles and interact with cell surface molecules during the infectious process. VP5* and VP8* failed to compete with viral particles probably because they lacked the conformational changes required to interact with cellular receptors. Our results give support to the hypothesis that conformational rearrangements in rotavirus particle proteins occur during the entry process which are similar to those generated in the HIV gp120 envelope glycoprotein conformation (Markovic *et al.*, 2004) or in the non-enveloped reovirus (Madren *et al.*, 2012) or poliovirus (Brandenburg *et al.*, 2007) structural proteins in order to expose critical proteins to cell receptors.

Taken together, the results presented here confirm the usefulness of recombinant proteins in the identification of protein interactions during virus entry into the host cell. However the sequence in which rotavirus VP5* and VP6 interact with Hsc70, PDI or other cellular proteins during entry remains to be determined in more detail.

Acknowledgements

This study was supported by a grant (No. 201010018595) awarded by Universidad Nacional de Colombia to support the strengthening of research and artistic creation groups.

References

- Arias, CF, Isa P, Guerrero, CA, Méndez, E, Zárate, S, López, T, Espinosa, R, Romero, P, López S. (2002). Molecular biology of rotavirus cell entry. *Arch Med Res*, 33 (4), 356-61.
- Beau, I, Cotte-Laffitte, J, Géniteau-Legendre, M, Estes, MK, Servin, AL. (2007). An NSP4-dependant mechanism by which rotavirus impairs lactase enzymatic activity in brush border of human enterocyte-like Caco-2 cells. *Cell Microbiol*, 9, 2254-66.
- Benureau, Y, Huet, JC, Charpilienne, A, Poncet, D, Cohen, J. (2005). Trypsin is associated with the rotavirus capsid and is activated by solubilization of outer capsid proteins. *J Gen Virol*, 86, 3143-51.
- Brandenburg, B, Lee, LY, Lakadamyali, M, Rust, MJ, Zhuang, X, Hogle, JM. (2007). Imaging poliovirus entry in live cells. *PLoS Biol*, 5(7), e183.
- Calderon, MN, Guerrero, CA, Acosta, O, Lopez, S, Arias, CF. (2012). Inhibiting rotavirus infection by membrane-impermeant thiol/disulfide exchange blockers and antibodies against protein disulfide isomerase. *Intervirology*, 55, 451-64.

- Calderon, MN, Guzmán, F, Acosta, O, Guerrero, CA. (2012). Rotavirus VP4 and VP7-Derived Synthetic Peptides as Potential Substrates of Protein Disulfide Isomerase Lead to Inhibition of Rotavirus Infection. *Int J Pept Res Ther.*, 18(4), 373-382.
- Coulson, B. S., Witterick, P. D., Tan, Y., Hewish, M. J., Mountford, J. N., Harrison, L. C., & Honeyman, M. C. (2002). Growth of rotaviruses in primary pancreatic cells. *Journal of virology*, 76(18), 9537-9544.
- Chung, CT, Niemela, SL, Miller, RH. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 86(7), 2172-5.
- De Marco, G., Bracale, I., Buccigrossi, V., Bruzzese, E., Canani, R. B., Polito, G., ... & Guarino, A. (2009). Rotavirus induces a biphasic enterotoxic and cytotoxic response in human-derived intestinal enterocytes, which is inhibited by human immunoglobulins. *Journal of Infectious Diseases*, 200(5), 813-819.
- Dormitzer, PR, Nason, EB, Prasad, BV, Harrison, SC. (2004). Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature*, 430, 1053 - 1058.
- Edman, J, Ellis, L, Blacher, R, Roth, R, Rutter, W. (1985). Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. *Nature*, 317(19), 267 - 270.
- Esposito, D. H., Holman, R. C., Hablerling, D. L., Tate, J. E., Podewils, L. J., Glass, R. I., & Parashar, U. (2011). Baseline estimates of diarrhea-associated mortality among United States children before rotavirus vaccine introduction. *The Pediatric infectious disease journal*, 30(11), 942-947.
- Estes, MK, Kapikian, AZ. (2007). Rotaviruses and their replication. In Fields Virology. Knipe, D.M. & Howley, P.M (ed). 5th edition; Philadelphia, PA; Lipincott -Williams and Wilkins.
- Estes, MK, Graham, DY, Mason, BB. (1981). Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J Virol.*, 39, 879-888.
- Fogh, J, Fogh, JM, Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumor in nude mice. *J Natl Cancer Inst.*, 59, 221-6.
- Frangioni, JV, Neel, BG. (1993). Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem.*, 210(1), 179-87.
- Garaicochea, L., Olichon, A., Marcoppido, G., Wigdorovitz, A., Mozgovoij, M., Saif, L., ... & Parreno, V. (2008). Llama-derived single-chain antibody fragments directed to rotavirus VP6 protein possess broad neutralizing activity *in vitro* and confer protection against diarrhea in mice. *Journal of virology*, 82(19), 9753-9764.
- Graham, K. L., Halasz, P., Tan, Y., Hewish, M. J., Takada, Y., Mackow, E. R., ... & Coulson, B. S. (2003). Integrin-using rotaviruses bind $\alpha 2\beta 1$ integrin $\alpha 2$ I domain via VP4 DGE sequence and recognize $\alpha X\beta 2$ and $\alpha V\beta 3$ by using VP7 during cell entry. *Journal of virology*, 77(18), 9969-9978.
- Gualtero, DF, Guzmán, F, Acosta, O, Guerrero, CA. (2007). Amino acid domains 280-297 of VP6 and 531-554 of VP4 are implicated in heat shock cognate protein hsc70-mediated rotavirus infection. *Arch Virol.*, 152, 2183-96.
- Guerrero, CA, Zárate, S, Corkidi, G, López, S, Arias, CF. (2000). Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J Virol.*, 74, 9362-71.
- Guerrero, CA, Méndez, E, Zárate, S, Isa, P, López, S, Arias, CF. (2000). Integrin $\alpha\beta 3$ mediates rotavirus cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97, 14644-9.
- Guerrero, C. A., Bouyssounade, D., Zárate, S., Iša, P., López, T., Espinosa, R., ... & Arias, C. F. (2002). Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *Journal of virology*, 76(8), 4096-4102.
- Halasz, P, Holloway, G, Turner, SJ, Coulson, BS. (2008). Rotavirus replication in intestinal cells differentially regulates integrin expression by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway, resulting in increased cell adhesion and virus yield. *J Virol.*, 82, 148-60.
- Haselhorst, T., Fleming, F. E., Dyason, J. C., Hartnell, R. D., Yu, X., Holloway, G., ... & von Itzstein, M. (2009). Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nature chemical biology*, 5(2), 91-93.
- Isa, P, Arias, CF, López, S. (2006). Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconj J.*, 23, 27-37.
- Isa, P, López, S, Segovia, L, Arias, CF. (1997). Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *J Virol.*, 71(9), 6749-6756.
- Jolly, CL, Beisner, BM, Ozser, E, Holmes, IH. (2001). Non-lytic extraction and characterisation of receptors for multiple strains of rotavirus. *Arch Virol.*, 146, 1307-23.
- Jourdan, N, Maurice, M, Delautier, D, Quero, AM, Servin, AL. (1997). Trugnan G. Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *J Virol.*, 71, 8268-78.
- Kaushik, R. S., Begg, A. A., Wilson, H. L., Aich, P., Abrahamsen, M. S., Potter, A., Griebel, P. (2008). Establishment of fetal bovine intestinal epithelial cell cultures susceptible to bovine rotavirus infection. *Journal of virological methods*, 148(1), 182-196.
- Laboissiere, M, Chivers, P, Raines, R. (1995). Production of rat protein disulfide isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif.* 6(5), 700-706.
- Lopez S, Arias CF. 2006. Early steps in rotavirus cell entry. *Curr Top Microbiol Immunol.* 309, 39-66.
- Londrigan, SL, Hewish, MJ, Thomson, MJ, Sanders, GM, Mustafa, H, Coulson, BS. (2000). Growth of rotaviruses in continuous human and monkey cell lines that vary in their expression of integrins. *J Gen Virol.*, 81, 2203-13.
- Macartney, KK, Baumgart, DC, Carding, SR, Brubaker, JO, Offit, PA. (2000). Primary murine small intestinal epithelial cells, maintained in long-term culture, are susceptible to rotavirus infection. *J Virol.*, 74, 5597-603.
- Madren, JA, Sarkar, P, Danthi, P. (2012). Cell entry-associated conformational changes in reovirus particles are controlled by host protease activity. *J Virol.*, 86(7), 3466-73.
- Markovic, I, Stantchev, T. S., Fields, K. H., Tiffany, L. J., Tomić, M., Weiss, C. D., ... & Clouse, K. A. (2004). Thiol/disulfide exchange is a prerequisite for CXCR4-tropic HIV-1 envelope-mediated T-cell fusion during viral entry. *Blood*, 103(5), 1586-1594.
- Maruri-Avidal, L, López, S, Arias, CF. (2008). Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus infectious particles. *J Virol.*, 82(11), 5368-80.
- Méndez, E, Arias, CF, López, S. (1993). Binding to sialic acids is not an essential step for the entry of animal rotaviruses to epithelial cells in culture. *J Virol.*, 67, 5253-9.
- Moreno, L. Y., Guerrero, C. A., & Acosta, O. (2013). Expression and purification of rotavirus structural proteins VP5* and VP8* in bacteria *E. coli* BL21 (DE3). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 82-97.
- Parashar, UD, Gibson, CJ, Bresee, JS, Glass, RI. (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 12, 304-6.
- Pesavento, JB, Crawford, SE, Estes, MK, Prasad, BV. (2006). Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 309, 189-219.
- Ramig, RF. (2004). Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. *J Virol.*, 78, 10213-10220.
- Ruiz, MC, Leon, T, Diaz, Y, Michelangeli, F. (2009). Molecular biology of rotavirus entry and replication. *Scientific World Journal.*, 9, 1476-97.
- Sahdev, S, Khattar, SK, Saini, KS. (2008). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem.*, 307 (1-2), 249-64.
- Servin, AL. (2003). Effects of rotavirus infection on the structure and functions of intestinal cells, p. 237-254. In U. Desselberger and J Gray (ed.), *Viral gastroenteritis*. Amsterdam, Netherlands; Elsevier Science BV.

- Sorensen, HP, Mortensen, KK. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.*, 115(2), 113-28.
- Svensson, L, Dormitzer, PR, von Bonsdorff, CH, Maunula, L, Greenberg, HB. (1994). Intracellular manipulation of disulfide bond formation in rotavirus proteins during assembly. *J Virol.*, 68(8), 5204-15.
- Tang, B, Gilbert, JM, Matsui, SM, Greenberg, HB. (1997). Comparison of the rotavirus gene 6 from different species by sequence analysis and localization of subgroup-specific epitopes using site-directed mutagenesis. *Virology*, 237(1), 89-96.
- Trask, SD, Kim, IS, Harrison, SC, Dormitzer, PR. (2010). A rotavirus spike protein conformational intermediate binds lipid bilayers. *J Virol.*, 84, 1764-70.
- Vargas, J, Romero, P, López, S, Arias, C. (2006). The Peptide-Binding and ATPase domains of recombinant hsc70 are required to interact with rotavirus and reduce its infectivity. *J Virol.*, 80(7), 3322-3331.
- Wolf, M, Vo, PT, Greenberg, HB. (2011). Rhesus rotavirus entry into a polarized epithelium is endocytosis dependent and involves sequential VP4 conformational changes. *J Virol.*, 85, 2492-503.
- Zárate, S, Espinosa, R, Romero, P, Méndez, E, Arias, CF, López, S. (2000). The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J Virol.*, 74, 593-9.
- Zárate, S, Romero, P, Espinosa, R, Arias, CF, López, S. (2004). VP7 mediates the interaction of rotaviruses with integrin $\alpha\beta 3$ through a novel integrin-binding site. *J Virol.*, 78, 10839 - 47.
- Zárate, S., Cuadras, M. A., Espinosa, R., Romero, P., Juárez, K. O., Camacho-Nuez, M., ... & López, S. (2003). Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *Journal of virology*, 77(13), 7254-7260.
- Zhang, Y, Wen, Y, Wei, H, Li, Ch, Fan, Y, Chen, Y. 2010. Expression of VP5* and VP8* of group A rotavirus and immunological characteristics. *China Biotechnology*, 30 (2), 32-38.

Evaluación del tratamiento anaerobio de las aguas residuales de una comunidad universitaria

Evaluation of the anaerobic treatment of domestic wastewaters of a university campus

Sandra Crombet Grillet^{*}, *Arelis Abalos Rodríguez*^{**}, *Suyén Rodríguez Pérez*^{***},
Norma Pérez Pompa^{****}

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57715

Resumen

En las universidades cubanas más del 65 % de los estudiantes son becarios y se presta especial atención a la gestión de las aguas domésticas generadas en las comunidades y residencias universitarias. Este trabajo presenta la remoción de la materia orgánica en las aguas domésticas de la comunidad universitaria Antonio Maceo de la Universidad de Oriente empleando, a escala de laboratorio, dos sistemas: reactor UASB y laguna anaerobia. Los sistemas anaerobios evaluados, alcanzaron una remoción de la DQO superior al 70 % y una disminución de las bacterias coliformes totales desde 72×10^5 NMP/100 mL hasta 16 NMP/100 mL. La clarificación con alumbre mejora las características estéticas del efluente. Cualquiera de las variantes (UASB o laguna anaerobia) pueden ser aplicadas para la remoción de la materia orgánica en las aguas domésticas de la comunidad universitaria.

Palabras clave: aguas residuales, comunidad universitaria, tecnología anaerobia, reactor UASB, laguna anaerobia.

Abstract

At cubans universities over the 65 % of students are grant holders and special attention lends itself to the steps of domestic waters generated in communities and university permanences. This work presents the removal of the organic matter in the university community's domestic waters Antonio Maceo of the Universidad de Oriente utilizing, to scale of laboratory two systems: UASB reactor and anaerobic lagoon. The anaerobic system evaluated attained a superior COD removal to the 70 % and decrease of bacteria's total coliformes from 72×10^5 NMP/100 mL to 16 NMP/100 mL. The clarification with alum improves the esthetic characteristics of the outflow. Anyone of variants (UASB or anaerobic lagoon) can be applied for the removal of the organic matter in the university community's domestic waters.

Key words: wastewater, university campus, anaerobic technology, UASB reactor, anaerobic lagoon.

Recibido: agosto 18 de 2015

Aprobado: abril 18 de 2016

Introducción

Las aguas residuales domésticas son aquellas procedentes de zonas de vivienda y de servicios, generadas principalmente por el metabolismo humano y las actividades domésticas, en los asentamientos poblacio-

nales. En general, su contenido de materia orgánica oscila entre 250 y 1400 mg/L de DQO y el de sólidos suspendidos totales entre 150-800 mg/L (Hernández, 2008; Rojas *et al.*, 2010). El vertido y manejo inadecuado de las aguas residuales domésticas impactan nega-

* MSc., Profesora Asistente. Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente. Patricio Lumumba s/n Santiago de Cuba. CP: 90500, Cuba. Email: sscrombet@uo.edu.cu.

** Ph.D., Profesora Titular. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente. Patricio Lumumba s/n Santiago de Cuba. CP: 90500, Cuba. Tel: +53-(226)-32095 Fax: +53-(226)-41701. Email: aabalos@uo.edu.cu.

*** Ph.D, Profesora Titular. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente. Patricio Lumumba s/n Santiago de Cuba. CP: 90500, Cuba. Email: suyen@cebi.uo.edu.cu.

**** MSc., Profesora Auxiliar. Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente. Patricio Lumumba s/n Santiago de Cuba. CP: 90500, Cuba. Email: norma@uo.edu.cu.

tivamente sobre el medio ambiente (Ortiz *et al.*, 2007). Por otro lado el tratamiento y reciclaje de las aguas residuales reduce la presión sobre la disponibilidad y calidad del agua, además de reducir la descarga de aguas no tratadas en los cuerpos receptores (Plevich *et al.*, 2012)

El tratamiento de aguas residuales domésticas se realiza aplicando una combinación procesos físico-químicos y biológicos, principalmente para remover sólidos sedimentables, disueltos y en suspensión, materia orgánica, metales, nutrientes y microorganismos patógenos). Los métodos físicos-químicos son menos aconsejables desde el punto de vista económico que los métodos biológicos, por el aporte continuo de reactivos y el tiempo de operación que requieren. Los procesos aerobios necesitan oxigenación continua, encareciendo el proceso y generando un alto volumen de lodos no estabilizados que deben ser tratados posteriormente (Ramdani, *et al.*, 2010; Torres, 2012). En las últimas décadas, existe un creciente interés en desarrollar procesos anaerobios para el tratamiento de aguas residuales con diferentes niveles de carga orgánica, en comparación con la implementación de los procesos aerobioestablecidos (Moscoso, 2011).

La tecnología anaerobia para el tratamiento de aguas residuales, se encuentra bien consolidada. Entre las principales ventajas se destacan: menor costo de instalaciones, no es necesario suministrar oxígeno por lo que el proceso es más económico y menor requerimiento energético, además de producir bajas cantidades de lodos si se compara con las tecnologías aerobias. También se puede implementar en sistemas compactos que requieren menor área de terreno, que los sistemas de lagunajes. No obstante, estos sistemas presentan desventajas como: requieren de un mayor tiempo de contacto o retención hidráulica, así como más tiempo de aclimatación lo que impide el tratamiento de grandes volúmenes de aguas residuales y dificultades para tratar aguas residuales con bajas cargas orgánicas. Por lo general, se requiere de un pos-tratamiento ya sea para descargar en los cuerpos receptores o para su reuso (Mara, 2004; Calijuri *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2010). En Cuba los sistemas anaerobios ha sido aplicados al tratamiento de residuos sólidos y líquidos (Guardia *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2000; López *et al.*, 2004), sin embargo se describen muy pocos estudios de tratamiento de aguas residuales domésticas, concentrándose estos en los residuales líquidos de instalaciones turísticas (Chao, 2005).

En las universidades cubanas, donde más del 65 % de los estudiantes son becarios, se presta especial atención a la gestión de las aguas residuales domésticas generadas en las comunidades universitarias y actualmente se fomentan los estudios relacionados con el medio ambiente, la gestión ambiental y el desarrollo sustentable. Algunas propuestas de soluciones se basan en el empleo de plantas acuáticas para depurar

el agua y re-utilizarla con fines ornamentales (Santana, 2002). Otros resultados apuntan hacia el cálculo de la huella ecológica con el objetivo de evaluar el impacto ambiental asociado a actividades de docencia, investigación y gestión universitaria en la Universidad Central de las Villas Martha Abreu (UCLV) y la implementación del estudio Mapa Verde como herramienta para el mejoramiento ambiental del campus universitario de Camagüey a partir del conocimiento de los impactos positivos y negativos que afectan el medio ambiente y generar acciones para acercarse al desarrollo sustentable, educando a la comunidad en una cultura ambiental (Pérez, 2013). Los principales problemas ambientales detectados en la Universidad de Oriente de Santiago de Cuba, se concentran en la residencia estudiantil Antonio Maceo, la segunda más grande del país y que forma parte de la comunidad universitaria de igual nombre. La gestión integral de los residuos líquidos es parte del reordenamiento ambiental de esta entidad (UO, 2011). En este trabajo se presenta la evaluación del tratamiento anaerobio para la remoción de la materia orgánica en las aguas domésticas de la comunidad universitaria Antonio Maceo de la Universidad de Oriente utilizando, a escala de laboratorio, dos sistemas: un prototipo de reactor UASB y una laguna anaerobia. La calidad del efluente tratado en los dos sistemas también se evalúa.

Materiales y métodos

Origen de las muestras

El estudio se realizó durante el curso académico 2012-2013. Las muestras se tomaron según describe APHA *et al.* (2005) en el desagüe donde confluyen todas las aguas residuales de la comunidad universitaria Antonio Maceo y que son descargadas en el sistema de alcantarillado. La toma de muestras se realizó en los horarios de mayor vertimiento de aguas residuales: 06:00-06:30 am., 12:30-13:00 pm., y 17:30-18:00 pm.; mezclándolas en un recipiente adecuado para obtener la muestra compuesta (RAS, 2000) para caracterizar.

Caracterización de las aguas residuales domésticas de la comunidad universitaria

Para realizar el estudio químico-físico de las aguas residuales de la comunidad universitaria Antonio Maceo de la Universidad de Oriente, se determinaron los siguientes parámetros ambientales: pH, temperatura (T), conductividad eléctrica (λ), sólidos totales (ST), sólidos totales fijos (STF), sólidos totales volátiles (STV), sólidos sedimentables (SS), sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos fijos (SSF), sólidos suspendidos volátiles (SSV), demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO₅), fosfato (PO₄³⁻), aceites y grasas (A y G), sulfuro (S²⁻), bacterias coliformes fecales (BCF), bacterias coliformes totales (BCT), metales, amonio (NH₄⁺) descritos en APPHA, 2005.

Para la realización de los ensayos de tratabilidad se tomaron muestras frescas y se determinaron los parámetros fundamentales para la operación del reactor: DQO, pH, SST.

Inóculo

Se utilizó sedimento del principal cuerpo receptor de las aguas residuales industriales y domésticas en la ciudad de Santiago de Cuba, conocido como río Yarayó (Fernández *et al.*, 2010). El sedimento se extrajo a 1 m de profundidad, con un muestreador de polietileno de 1L de capacidad, garantizando condiciones anaerobias. El mismo se conserva en un recipiente plástico a 8 °C hasta su utilización.

El sedimento que se utilizó como inóculo fue caracterizado en base al Índice Volumétrico de Lodo (IVL), Velocidad de sedimentación (Vsed), Sólidos Suspendidos Totales (SST), Sólidos Suspendidos Fijos (SSF), Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) y actividad metanogénica específica (AME). El análisis de los sólidos se realizó gravimétricamente según los procedimientos descritos en APHA (2005).

Actividad metanogénica del inóculo

Para evaluar la AME se desarrolló un estudio cinético a 30 °C en botellas de 500 mL de capacidad (figura 1) según Torres y Pérez (2010). Se añadieron 50mL del inóculo, 450 mL de medio (Visser *et al.*, 1995) que en su composición contiene macro y micronutrientes necesarios para el metabolismo de las bacterias anaerobias, además, acetato de sodio en concentraciones equivalentes a 1 g de DQO_{sustrato} por gramo de SSV_{inóculo} como fuente de carbono y energía (Durán, 2010). Previo a la adición del acetato se agota el inoculo por 24 h en el mismo medio de experimentación para descartar la producción endógena de metano. Se midió la producción diaria de metano, utilizando el método del desplazamiento (figura 1) de una solución de NaOH al 5% (Cendales, 2011). Los ensayos se realizaron por triplicado.

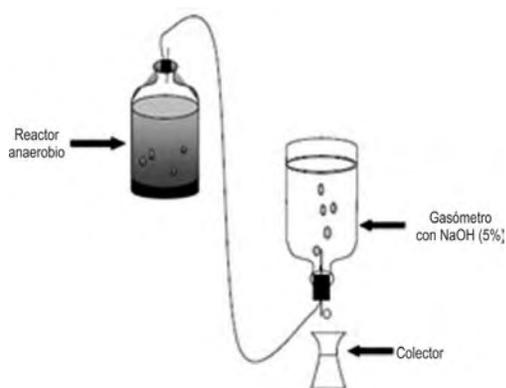


Figura 1. Equipamiento de laboratorio utilizado para evaluar la actividad metanogénica específica (AME) por el método de desplazamiento. **Fuente:** Fernández, *et al.* (2010).

La AME se calculó mediante la ecuación siguiente:

$$AME_{(g\ DQO/g\ SSV*d)} = \frac{m * 24}{FC * V * SSV} \quad (1)$$

donde:

- AME: Actividad Metanogénica Específica.
- FC: Factor de Conversión que expresa que 1g de DQO= 0,382 L de CH₄.
- m: pendiente del gráfico de producción acumulada de CH₄ en función del tiempo (CH₄/h).
- SSV: Concentración de Sólidos Suspendidos Volátiles del inóculo (g/L).
- V: Volumen efectivo líquido en el digestor (L).

Tratamiento anaerobio de las aguas residuales domésticas de la comunidad universitaria Antonio Maceo de la Universidad de Oriente

Los ensayos de tratabilidad se evaluaron utilizando un prototipo de reactor UASB y una simulación de laguna anaerobia, alimentados con agua residual fresca y operando en régimen continuo.

Se utilizó un reactor UASB de 2,50 L de volumen útil (figura 2a), flujo de 3,1 L/día con un tiempo de retención hidráulico (TRH) de arranque de 0,8 días, disminuyéndolo paulatinamente hasta el TRH de diseño de 0,50 días. La laguna anaerobia se diseñó en un recipiente de laboratorio de 5.0 L de volumen útil que simula el estanque (hxd, 30 x 14 cm) donde permanece el agua residual doméstica (figura 2b), flujo de 4,5 L/día y se trabajó con un TRH de 1,1 días.

Se inoculó el sedimento del río Yarayó en ambos reactores, asegurando un volumen de no menos del 20% del volumen útil. Se dejó en reposo, en lote, 24 h. Posteriormente se operó el arranque con carga orgánica volumétrica (COV) de 0,5 kg/m³d. La etapa de arranque se consideró hasta la estabilización del reactor con más del 50% de remoción de la DQO.

$$\% R_{DQO} = \frac{DQO_i - DQO_f}{DQO_i} * 100 \quad (2)$$

Los dos reactores se alimentaron continuamente con las aguas residuales domésticas de la comunidad universitaria Antonio Maceo, midiéndose potenciométricamente el pH del medio, SST al inicio del proceso, producción diaria de metano y la DQO para calcular el porcentaje de remoción de la DQO (%R_{DQO}) mediante la ecuación siguiente:

donde:

DQO_i y DQO_f: son las Demandas Químicas de Oxígeno (mg/L) inicial y final.

El efluente, de ambos sistemas, se clarifica con sulfato doble de aluminio y amonio (0,25g de sal por 500 mL de efluente).

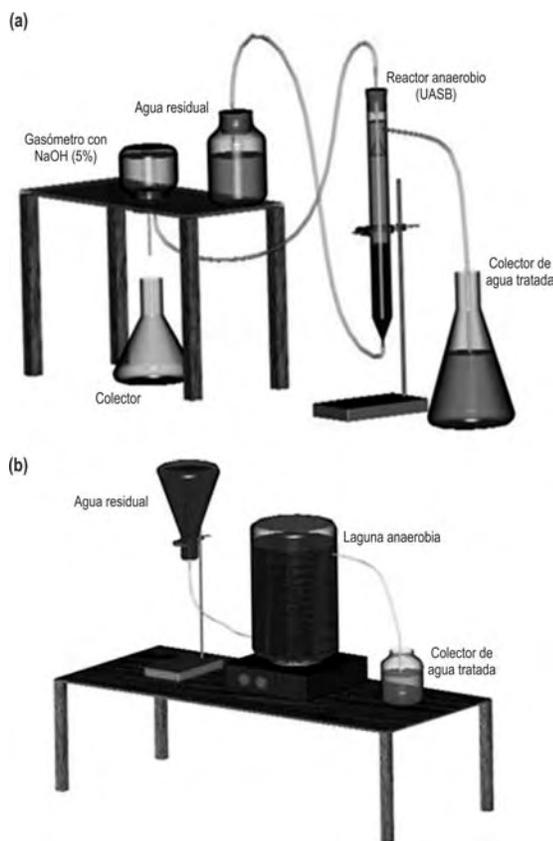


Figura 2. Prototipos de reactor UASB (a) y laguna anaerobia (b) para el tratamiento de las aguas residuales de la comunidad universitaria Antonio Maceo.

Análisis de los resultados

Se evaluó el comportamiento de los parámetros de respuesta DQO y producción de metano en el tiempo tanto para el reactor UASB (considerando que el reactor haya sobrepasado la etapa de arranque) como la laguna anaerobia. El tiempo prefijado para la evaluación fue mayor o igual que 10 TRH. Finalizado el tratamiento anaerobio se evaluó además, en ambos sistemas, la cantidad de BCT y BCF.

Resultados y discusión

Las aguas residuales domésticas de la comunidad universitaria Antonio Maceo mantienen coloración gris y aspecto turbio, olor desagradable, sin presencia de material flotante (Crombet *et al.*, 2013). Los parámetros ambientales DQO, DBO₅, sólidos, aceites y grasas y microorganismos coliformes (tabla 1) se encuentran fuera del límite permisible para la descarga al sistema de alcantarillado según la Norma Cubana (NC 27: 2012) y son los que determinan la contaminación en estas aguas. Estas aguas poseen los nutrientes necesarios para un proceso de arranque y operación en reactores anaerobios (Terry *et al.*, 2008).

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de las aguas residuales de la comunidad universitaria Antonio Maceo, n=3.

Parámetros	Rango
T (°C)	22-28
pH(U)	6,8-7,7
Turbidez (UTN)	41-102
λ (mS/cm)	606-772
DQO dic. (mg/L)	190-306
DBO ₅ (mg/L)	59-112
S ²⁻ (mg/L)	0-23,2
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	1,3-3,7
P-PO ₄ ⁻ (mg/L)	2,0-18,8
A y G (mg/L)	33,2-67,9
Sol. Sed (ml/L)	2,0-4,5
ST (mg/L)	476-1197
STF (mg/L)	276- 850
STV (mg/L)	194- 358

Caracterización del inóculo y ensayo de biodegradabilidad de las aguas residuales de la Comunidad Universitaria "Antonio Maceo"

Se tienen experiencias anteriores del empleo del SRY en tratamientos anaerobios de aguas residuales (Bermúdez *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2010). El IVL, Vse-dy la AME son parámetros indispensables para evaluar la calidad del inóculo. Los dos primeros muestran las características físicas y el otro expresa las características metabólicas de los microorganismos presentes. Para la determinación de estos parámetros es necesario conocer el contenido de los sólidos suspendidos presentes en las muestras, lo que también puede ser empleado como criterio de selección de un inóculo.

La concentración de SST en el inóculo SRY fue de 107,07 g/L, mientras que para los Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) fue de 34,6 g/L para un 32,3% de SSV en el inóculo. A mayor concentración de SSV, mayor presencia de microorganismos; los cuales son el núcleo del proceso de granulación. Ghangrekar (2005), observó que la proporción de SSV con respecto a la cantidad de SST superior a 0,4 favorece la granulación cuando se trabaja con lodos no granulares. La relación SSV/SST en el lodo SRY fue 0,32, lo que demuestra que es un lodo no granular y la granulación no se ve favorecida.

El IVL obtenido fue de 7,94 mL/g SST. Este parámetro evalúa la capacidad de sedimentación o compactación del lodo y representa que un gramo de biomasa

de muestra ocupa un volumen de 7,94 mL en 30 min de sedimentación. Por su parte la V_{sed} del lodo SRY fue 64,69 m/h. Si bien los mejores valores de IVL y V_{sed} (Mancera, 2012) se encuentran en el rango de 10–20 mL/g SST y 40–100 m/h respectivamente; los valores de V_{sed} y IVL obtenidos favorecen el empleo del lodo SRY en un reactor UASB sin que se produzca la eliminación del mismo por el flujo ascendente.

En la cinética de producción de metano (figura 4) del lodo SRY se observó una producción acumulada del gas 380 mL en 9 días de experimentación, equivalente a 42,2 mL/día. La actividad metanogénica permite evaluar la población microbiana metanogénica en el inóculo y su actividad metabólica frente a determinado sustrato para su conversión a metano (Fernández et al., 2010). Se cuantificaron 0.074 g DQO CH_4 /gSSV*d como AME del inóculo SRY, siendo 15 veces mayor que el reportado para fuentes de inóculo de sedimentos de río, según Montalvo y Guerrero (2003). El nivel de deterioro del río Yarayó, desagüe donde vierten sus aguas residuales la zona industrial de la ciudad y los asentamientos urbanos aledaños, condiciona esta actividad metanogénica.

Tratamiento biológico de las aguas domésticas de la comunidad universitaria en prototipo UASB y laguna anaerobia

El tratamiento de las aguas residuales de la comunidad universitaria puede llevarse a cabo empleando las lagunas anaerobias y los reactores UASB, debido a los bajos costos de instalación y operación de estos sistemas y que se requiere de áreas reducidas para su construcción.

Los sistemas diseñados (figuras 2 y 3) operaron durante dos meses a una temperatura promedio de 28,2 °C correspondiente al inicio del verano. En la figura 5 se presenta la variabilidad del contenido de materia orgánica, como consecuencia del quehacer cotidiano en la comunidad universitaria, expresada por los valores

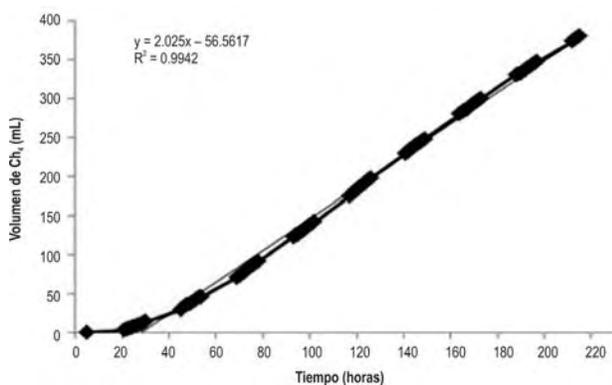


Figura 3. Cinética de producción de metano del lodo SRY en los ensayos de biodegradabilidad de las aguas residuales de la comunidad universitaria Antonio Maceo.

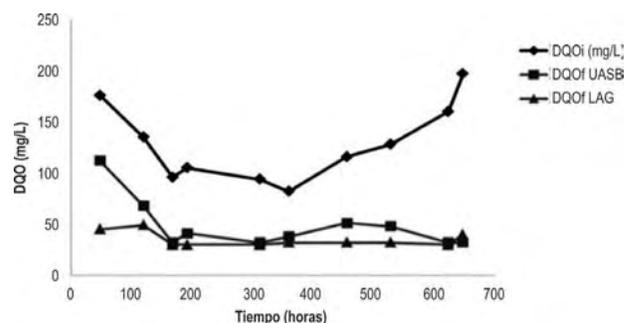


Figura 4. Valores de DQO de entrada (DQO_i) y salida del agua residual durante el tratamiento en los dos sistemas: reactor UASB (DQO_f UASB) y laguna de anaerobia (DQO_f LAG).

de DQO inicial y final en el agua residual durante el período de tratamiento. La variabilidad observada es atribuible a la especificidad de actividades que se realizan diariamente en los edificios, cocina-comedor y cafetería; áreas que aportan efluentes que convergen en la estación de muestreo y forman las aguas domésticas de la comunidad. Como se refleja en el gráfico, el contenido de materia orgánica en las aguas domésticas residuales disminuye en ambos sistemas; alcanzándose valores inferiores a los 120mg/L que establece la Norma Cubana para descargar residuales líquidos en aguas terrestres y alcantarillados (NC 27: 2012). Se destaca que desde el inicio del tratamiento en la laguna la DQO del efluentes se estabilizó alrededor de los 30 mg/L (figura 5).

La eficiencia promedio de remoción de DQO (% R_{DQO}) durante la operación fue superior al 50 %, siendo superior en el tratamiento mediante laguna anaerobia (70,3 %) comparado con el UASB (53,8 %) (figura 6). Se conoce que sistemas que operan bajo condiciones semejantes alcanzan porcentajes de eficiencia similares (Lorenzo, 2006; Rojas et al., 2010).

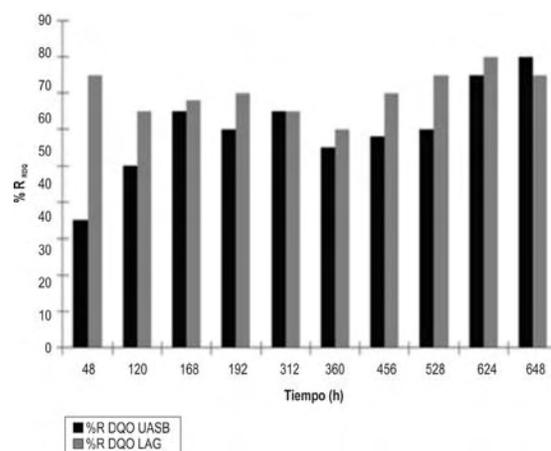


Figura 5. Eficiencia de remoción del contenido de materia orgánica (%R DQO) en el reactor UASB y laguna de anaerobia (LAG) en función del tiempo.

La variabilidad en la remoción de la materia orgánica en el reactor UASB durante el período de arranque, puede ser atribuible a las características del inóculo que refleja la necesidad de adaptarlo a las presiones de selección que le impone el reactor UASB operando en modo continuo a TRH de aproximadamente 0,8 días, estableciéndose un flujo ascendente alto; lo que propicia la fuga del reactor de partículas en suspensión en las cuales hay adherencia de los microorganismos que participan en la conversión de esa materia orgánica; situación esta que reduce la población efectiva, incidiendo en el funcionamiento estable del propio reactor (Cervantes *et al.*, 2012). El flujo utilizado de 3,1 L/día no favoreció el contacto inicial biomasa-agua residual dentro del reactor y a pesar que en la operación del reactor se reduce el TRH, se logra estabilizar alrededor de los 26 días los valores de remoción de materia orgánica superiores al 70%. Esto podría ser evidencia de la maduración del lecho granular, por incremento de la biomasa y con ello la densidad del floculo/gránulo, reduciendo la pérdida que se describió en la etapa de arranque. Esta argumentación se corrobora con los valores de sólidos determinados en el efluente del tratamiento UASB, de 32 mg SST/L al inicio de la etapa de arranque (Van Haandel *et al.*, 2006).

El pH, durante la etapa de experimentación, osciló entre 7,4 y 7,8 unidades en ambos sistemas, lo que demuestra la no acumulación de Ácidos Grasos Volátiles (AGV) por las propias características del residual tratado, favoreciéndose así todas las etapas del proceso hasta la metanogénesis (Boe *et al.*, 2010). Los valores de pH cercanos a los recomendados para el tratamiento anaerobio; así como, la no presencia de altas cargas orgánicas fácilmente fermentables y/o acidificables, hacen viables el tratamiento sin necesidad de un previo de ajuste de pH a los deseados en el tratamiento anaerobio (6,5-8) y excluyendo el parámetro de relación de alcalinidad, como parámetro de monitoreo. Los AGV a estos valores de pH están mayoritariamente en su forma ionizada, que no es tóxica para las bacterias y propicia un aporte de iones H⁺ que regularía la tendencia a pH mayores a 7 (Bello, R. 1995).

La producción de metano detectada en el reactor UASB fue nula. Esto se debe al bajo contenido de materia orgánica que presentan las aguas residuales de la comunidad universitaria; cuya transformación en metano no es significativa para su detección por un sistema de desplazamiento líquido (figura 2a).

Si bien la NC 27:2012 no establece requisitos de calidad respecto a bacterias coliformes, el análisis microbiológico del influente y el efluente, tanto en el reactor UASB como en la laguna anaerobia, reveló la remoción de microorganismos patógenos; cumpliendo con los requisitos establecidos por la OMS y la Agencia de Protección Ambiental (EPA) (Asela, 2009). Se contaron 72×10^5 y 36×10^5 NMP/100mL de bacterias coliformes totales (BCT) y fecales (BCF) respectivamente en el in-

fluente. En el efluente del reactor UASB se detectaron menos de 16 NMP/100 mL tanto para BCT como BCF. Por su parte en la laguna anaerobia se obtuvieron valores de 16 NMP/100 mL para BCT y 2,2 NMP/100 mL para BCF.

Finalizado el tiempo de operación de ambos bioreactores, se aplicó a los efluentes de los sistemas diseñados alumbre amónico [AlNH₄(SO₄)₂.12 H₂O] como post-tratamiento, favoreciendo la clarificación y remoción de los sólidos suspendidos que pudieron ser arrastrados. Como resultado se redujeron los valores de DQO hasta 10mg/L (UASB) y 12 mg/L (laguna anaerobia), obteniéndose un efluente final incoloro, transparente e inodoro. Los valores de coliformes fueron inferiores a 3NMP/100mL, mejorando la calidad sanitaria del efluente. El precio de los alumbres para tratamiento de agua oscila entre 0,15-0,35 \$USD/kg (<http://es.made-in-china.com>), siendo bajo el incremento del costo por la incorporación de este producto al sistema de tratamiento; sin embargo se mejoran las características del efluente, permitiendo mayores posibilidades de su reuso.

Algunas consideraciones sobre los sistemas anaerobios evaluados

En los dos sistemas anaerobios evaluados se obtuvieron valores de remoción de materia orgánica superiores al 70 %, cumpliendo las regulaciones de descarga de la Norma Cubana 27: 2012.

Las lagunas anaerobias, por lo general tienen una profundidad de 2-5 m y reciben cargas orgánicas volumétricas mayores de 100 g DBO₅/m³d. En términos generales, funcionan como tanques sépticos abiertos y operan satisfactoriamente en climas cálidos (Alves, 2007). Para tratar las aguas residuales de la comunidad universitaria Antonio Maceo resulta suficiente un TRH de 1 día aproximadamente, ya que los valores de DBO₅ no superan los 300 mg/L. Por otro lado, las lagunas anaerobias constituyen una tecnología de tratamiento efectiva y más económica para la remoción de materia orgánica y microorganismos patógenos que los reactores UASB. La desventaja radica en que son sistemas abiertos que exigen impermeabilización del terreno para evitar contaminaciones al manto freático por filtración y mayores extensiones de terreno para su implementación.

Por su parte, los reactores anaerobios UASB son sistemas ingenieriles muy apropiados para trabajar en condiciones de variabilidad de carga, teniendo como ventajas su compactación y diseño vertical, así como sus bajos tiempos de retención hidráulica, que facilita el tratamiento de grandes volúmenes de agua en poco tiempo (Torres, 2012).

Considerando los resultados obtenidos en los principales indicadores bajo estudio, en ambos sistemas de tratamiento, es posible para la institución; aplicar

cualquiera de las variantes (UASB o laguna anaerobia) para la remoción de la materia orgánica en las aguas domésticas de la comunidad universitaria Antonio Maceo. El diseño eficiente y económico de un sistema de tratamiento de aguas residuales requiere de un estudio basado en aspectos, tales como: caudal (m^3/s), el uso del efluente tratado, área disponible para la instalación del sistema, viabilidad económica y características meteorológicas (clima, precipitación) entre otros.

Conclusiones

Los sistemas anaerobios evaluados, UASB y laguna anaerobia, alcanzan una remoción de la materia orgánica en las aguas domésticas de la comunidad universitaria superior al 70%, pudiendo emplearse alternativamente uno u otro sistema ya que con ambos mejora la calidad del efluente y se favorecesu reutilización.

Agradecimientos

Al MSc. Orlando Calderín Medina por su colaboración en el diseño de los reactores y al profesor Yoennis Díaz Moreno en la revisión del trabajo.

Referencias bibliográficas

- Alves, P. (2007). Diagnóstico operacional de lagoas de estabilização. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Engenharia Sanitária para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Sanitária. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. Brasil, p 169.
- APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. 2005. American Public Health Association, Washington, pp. 5-72.
- Asela, L., Veliz, E., Llanes, J. G. y Bataller, M. (2009). Reúso de aguas residuales domésticas para riego agrícola. Valoración crítica. *CENIC Ciencias Biológicas*, 40(1),35-44.
- Bello, R. (1995). Potencial de aplicación de la digestión anaerobia en el tratamiento de aguas residuales del beneficio del café. Tesis profesional Instituto Tecnológico de Tapachula. México, pp.51-92.
- Bermúdez, R.C., Rodríguez, S., Martínez, M.C., Terry, A.I. (2003). Ventajas del empleo de reactores UASB en el tratamiento de residuales líquidos para la obtención de biogás. *Tecnología Química*, 23 (2),37-44.
- Boe, K., Batstone, D.J., Steyer J.P., Angelidaki, I. (2010). State indicators for monitoring the anaerobic digestion process. *Water Research*,44 (20), 5973-5980.
- Calijuri, M., Xavier, R.K., De Brito, T., Cesca, B., Oliveira, E.H. (2009). Tratamento de esgotos sanitários em sistemas reatores UASB/wetlands construídas de fluxo horizontal: eficiência e estabilidade de remoção de matéria orgânica, sólidos, nutrientes e coliformes. *Eng Sanit Ambient*, 14(3),421-430.
- Cendales, E.D. (2011). Producción de biogás mediante la cogestión anaeróbica de la mezcla de residuos cítricos y estiércol bovino para su utilización como fuente de energía renovable. Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de Magíster en Ingeniería Mecánica. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, DC, Colombia. p 82.
- Cervantes, I., Cruz, M.R., Aguilar, R., Monroy, O., Castilla, P., Meraz, M. (2012). Caracterización físico química y microbiológica de un reactor UASB escala piloto. Informe de operación de la planta de tratamiento. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. México. p 11.
- Chao, C. (2005). Análisis del aprovechamiento de agua residual tratada como agua de reúso para riego de áreas verdes en las instalaciones hoteleras. Informe técnico. Inmobiliaria ALMEST. p 20.
- Crombet, S., Pérez, N., Ábalos, A., Rodríguez, S. (2013). Caracterización de las aguas residuales de la comunidad Antonio Maceo de la Universidad de Oriente. *Cubana de Química*, 25(2), 134-142.
- Durán, U. (2010). Estudio fisiológico y poblacional de un proceso microbiológico metanogénico con oxígeno para la eliminación de acetato de vinilo. Tesis en opción al grado de Doctor en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. México. p 97.
- Fernández, M., Abalos, A., Crombet, S., Caballero, H. (2010). Ensayos de biodegradabilidad anaerobia de aguas residuales generadas en una planta refinadora de aceite de soja. *Interciencia*, 35(8), 600-604.
- Ghangrekar, M., Asolekar, S., Joshi, S. (2005). Characteristics of sludge developed under different loading conditions during UASB reactor start-up and granulation. *Water Research*, 39(6), 1123-1133.
- Guardia, Y., Rodríguez, S., Jiménez, J., Sánchez, V. (2013). Performance of a UASB reactor treating coffee wet wastewater. *Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 22(3), 35-41.
- Hernández, H. (2008). Evaluación de tecnologías de tratamientos descentralizados de aguas residuales domésticas para comunidades periurbanas empleando criterios de sostenibilidad. Diplomado en gestión ambiental. Instituto de Geografía Tropical. La Habana. Cuba. p 58.
- López, M., Espinosa, M.C., Escobedo, R., Delgado, J. (2004). Gestión integral de los residuos urbanos sólidos y líquidos en Cuba. *Tecnología, Ciencia, Educación*, 19(1), 5-13.
- Lorenzo, Y., Obaya, M. C. (2006). La digestión anaerobia y los reactores UASB. Generalidades. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 60(1), 13-21.
- Mancera, M. R. (2012). Efecto de la disminución de la carga orgánica sobre las características de los lodos granulares anaerobios. Especialización en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. México. p 50.
- Manufacturas, proveedores y productos de China. (2014). Consultado el: 14 de noviembre de 2014]. Disponible en: http://es.made-in-china.com/tag_search_product/Water-Treatment-Chemicals-Alum_hgsunon_1.html
- Mara, D.D. (2004). *Domestic Wastewater Treatment in Developing Countries*. Earthscan, London, Sterling, VA, p 310.
- Montalvo, S., Guerrero, L. (2003). Tratamiento anaerobio de residuos. Producción de Biogás. Ed. Universidad Técnica Federico Santa María. p 5-366.
- Moscoso, J. C. (2011). Estudio de opciones de tratamiento y reúso de aguas residuales en Lima Metropolitana. University of stuttgart. Germany (www.lima-water.de), p 90.
- NC 27:2012. Vertimiento de aguas residuales a las aguas terrestres y Alcantarillados. Especificaciones. Oficina Nacional de Normalización. La Habana. Cuba, p 14.
- Ortiz, M., Raluy, R.G., Serra, L., Uche, J. (2007). Life cycle assessment of water treatment technologies: wastewater and water-reuse in small town. *Desalination*, 240(1-3),121-131.
- Pérez, R. (2013). Procedimiento para evaluar los impactos ambientales en la Universidad de Oriente. Tesis presentada en opción al título de máster en Hábitat y Medio Ambiente en zonas sísmicas. Universidad de Oriente. p 110.
- Plevich, J., Delgado, A.R., Saroff, C., Tarico, J., Crespi, R.J., Barotto, O. (2012). El cultivo de alfalfa utilizando agua de perforación, agua residual urbana y precipitaciones. *Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 16(12), 1353-1358.

- Ramdani, A., Dold, P., Délérís, S., Lamarre, D., Gadbois, A., Comeau, Y. (2010). Biodegradation of the endogenous residue of activated sludge. *Water Research*, 44(7), 2179-2188.
- RAS. (2000). Reglamento técnico del sector de agua potable y saneamiento básico. Sección II: Tratamiento de aguas residuales. Colombia. Bogotá D.C., p 145.
- Rodríguez, S., Pérez, R.M., Fernández, M. (2000). Estudio de la biodegradabilidad anaerobia de las aguas residuales del beneficio húmedo del café. *Interciencia*, 25(8), 386-390.
- Rojas, N., Sánchez, A., Matiz, A., Salcedo, J.C., Carrascal, A.K. (2010). Evaluación de tres métodos para la inactivación de coliformes y *Escherichia coli* presentes en agua residual doméstica, empleada para riego. *Universitas Scientiarum*, 15(2), 139-149.
- Santana, D. (2002). Uso de plantas acuáticas en el tratamiento de agua y aguas residuales en la Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos. *Avanzada Científica*, 5(2), 15-21.
- Skoog, D. A., Holler, F.G., Nicman. (2005). *Principios del Análisis Instrumental*. 5ta edición. Ed. McGraw Hill. USA. 1028 pp.
- Tavares, J., van Haandel, A.C., da Silva P.R., Arruda, A.V. (2000). Pós-tratamiento de efluente de reactor UASB utilizando sistemas "wetlands" construídos. *Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 4(1), 87-91.
- Terry, A., Fernández, M., Zenia, D. (2008). Consideraciones generales para el desarrollo de una estrategia de granulación en reactores UASB. *Tecnología Química*, 28(1), 70-79.
- Torres, P. (2012). Perspectivas del tratamiento anaerobio de aguas residuales domésticas en países en desarrollo. 18, 115-129.
- Torres, P., Pérez, A. (2010). Actividad Metanogénica Específica: una herramienta de control y optimización de sistemas de tratamiento anaerobio de aguas residuales. *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente*, 9,5-14.
- Universidad de Oriente. 2011. Estrategia Ambiental de la Universidad de Oriente 2007-2011. [consultado: 9 de abril 2012]. Disponible en: <http://medioambiente.uniblog.uo.edu.cu/files/2011/01/ESTRATEGIA-AMBIENTAL-DE-LA-UO-2011.pdf>
- Van Haandel, A., Kato M.T., Cavalcanti, P., Florencio, L. (2006). Anaerobic reactor design concepts for the treatment of domestic wastewater. *Environmental Science and Bio/Technology*, 5 (1), 21-38.

Comparación del potencial oxidativo de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, en un proceso de biodesulfurización de carbón

Comparison of the oxidative potential of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, in biodesulphurization process of coal

María Prada Fonseca^{*}, Gerardo Caicedo Pineda^{**}, Marco Márquez Godoy^{***}

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.50274

Resumen

En este estudio se comparó la actividad oxidativa de dos cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en un proceso de desulfurización, empleando un carbón sub-bituminoso alto en azufre (2.30% de azufre total, con 1.06% pirítico, 1.10% orgánico y 0.14% de sulfatos), proveniente de la mina "La Guacamaya" ubicada en Puerto Libertador -Córdoba, Colombia. Se realizaron ensayos a nivel de erlenmeyer, la concentración de hierro total en la solución fue de 200 mg/L y 1200 mg/L respectivamente, empleando sulfato ferroso. El proceso fue monitoreado mediante mediciones periódicas de los principales factores físico-químicos implicados (pH, potencial de óxido-reducción (Eh), hierro en solución y concentración celular). Según los resultados obtenidos, la mayor eficiencia del proceso se logró, al trabajar con microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y una concentración de sulfato ferroso inicial de 1200 mg/L, el cual obtuvo la mayor tasa de oxidación de pirita (Py oxidada) (68%), así como, mejores condiciones en el medio lixivante (pH: 1,47; Eh: 625 mV; 6.3×10^8 células/mL) en comparación con el cultivo axénico a las mismas condiciones (Py oxidada: 52%, pH: 1,63, Eh: 580 mV, 5.1×10^8 células/mL), después de 12 días de experimentación.

Palabras clave: bacteria, pirita, biolixiviación, sulfato ferroso.

Abstract

This study aimed comparing the oxidative activity of two strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in a desulphurization process, using a sub-bituminous coal with a high sulfur content (2.30% total sulfur: 1.06% as pyritic, 1.10% as organic and 0.14% from sulfates) from "La Guacamaya" mine, located in Puerto Libertador - Cordoba, Colombia. Several assays were performed in Erlenmeyer flasks, the total iron concentration used in solution were 200 mg/L and 1200 mg/L respectively, using ferrous sulfate. The process was monitored by periodically measuring the main physicochemical factors involved (pH, Eh, cell population and iron in solution). According to the results obtained, the highest efficiency of the process was achieved by working with microorganisms compatible with *Acidithiobacillus ferrooxidans* and initial concentration of 1200 mg/L of ferrous sulfate, which had higher pyrite oxidation rates (Py oxidized) up to 68% and the best experimental conditions in the leaching medium (pH: 1,47; Eh: 625 mV; 6.3×10^8 cells/mL), in comparison with the axenic culture on the same conditions (Py oxidized: 52%; pH: 1,63; Eh: 580 mV; 5.1×10^8 cells/mL), after 12 days of experimentation.

Key words: bacteria, pyrite, bioleaching, ferrous sulfate.

Recibido: septiembre 16 de 2015

Aprobado: abril 26 de 2016

Introducción

A nivel mundial, el carbón colombiano es reconocido por tener bajo contenido de cenizas, azufre, ser alto en volátiles y tener un alto valor calorífico (UPME,

2007). No obstante, en algunas regiones la cantidad de algunos componentes presentes en este combustible, tales como el azufre (orgánico e inorgánico) le restan valor y obligan a la aplicación de tratamientos para su utilización (León, 2006).

* MSc. Ingeniería de Materiales y Procesos, Universidad Nacional de Colombia -Sede Medellín, Calle 51 # 78 A - 73, mcprada@unal.edu.co

** PhD. Ingeniería ciencia y tecnología de los materiales, Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín, Calle 10 A # 43D -96, gacaiced@unal.edu.co

*** PhD. Mineralogía, Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín, Carrera 80 # 65 -223, mmarquez@unal.edu.co

El dióxido de azufre (SO₂) es uno de los gases más tóxicos que contaminan el ambiente, formado principalmente como un subproducto de la combustión del azufre (Chou, 2012). La necesidad de obtener carbones con bajo contenido de este elemento a partir de carbones de baja calidad, ha dado lugar a una gran cantidad de métodos de extracción de azufre basados en técnicas físicas y químicas, pero su utilización requiere altos capitales de inversión, genera residuos y efluentes contaminantes (Prayuenyong, 2002). Por esta razón, los métodos biológicos han despertado gran interés, debido no solo a que presenta altas eficiencias para extraer piritita del carbón, sino porque requiere bajos capitales de inversión y sus subproductos no deterioran el ambiente (Caicedo, 2008).

Los procesos de biolixiviación se basan fundamentalmente en el uso de microorganismos acidófilos, capaces de prosperar y oxidar sulfuros metálicos insolubles tales como la piritita, en un medio acuoso, con el fin de lixiviar el azufre en forma de sulfatos (Aller *et al.*, 2001; Cara *et al.*, 2005; Harneit *et al.*, 2006). Estudios previos sobre el comportamiento bacteriano en presencia de azufre inorgánico han sido en su mayoría llevados a cabo empleando *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Johnson & Hallberg, 2003). Los resultados de estos estudios son variables debido a las condiciones del medio lixivante. Por ejemplo, (Caicedo & Marquéz, 2011) obtuvieron 50% de oxidación de azufre piritítico, empleando concentraciones de hierro iniciales menores a 1200 mg/L y un cultivo celular mixto (*Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*). Por otra parte, (Cardona, 2008) alcanzó una oxidación de piritita del 85% empleando microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y 95% con un cultivo mixto (*Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*), variando el tamaño de partícula del carbón y usando una concentración de hierro ferroso de 1000 mg/L. Finalmente, (Peláez *et al.*, 2013) alcanzaron un 74% de oxidación de piritita empleando una relación inicial de iones Fe³⁺/Fe²⁺ y una concentración de hierro total de 1200 mg/L, en un proceso de biodesulfurización de carbón empleando un cultivo axénico de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Si bien una serie de bacterias han sido descritas como eficientes en los procesos de biooxidación de piritita del carbón, es poco lo que se sabe sobre su comportamiento en ambientes complejos, en particular, la influencia de la actividad oxidativa de las bacterias en presencia de diferentes concentraciones de hierro ferroso total, como única fuente soluble de energía disponible. El propósito de esta investigación es comparar la actividad oxidativa de un cultivo compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* vs. una cepa axénica de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, a nivel de laboratorio, al variar la concentración inicial de hierro ferroso en el sistema, y determinar si los iones Fe²⁺ adicionales aumentan la eficiencia del proceso de biodesulfurización de un carbón proveniente del municipio de

Puerto Libertador - Córdoba, Colombia, es decir, si se incrementa la remoción de azufre inorgánico presente en el carbón.

Materiales y métodos

Tipo de muestra y preparación del carbón

La muestra de carbón fue tomada de la mina "La Guacamaya" (Puerto Libertador, Córdoba-Colombia). A esta se le realizaron cuarteos sucesivos y se le redujo el tamaño de grano -60# Tyler (0.246 mm = 246 μm), empleando un molino de bolas. Con el fin de evaluar las propiedades de la muestra tomada, se realizaron análisis de las formas de azufre presentes en el carbón, bajo la norma ASTM D 2492-02, siguiendo los pasos descritos para la medición de azufre total ASTM 4239-14. Así como análisis próximos a la muestra según las normas ASTM D 3173-11 (Humedad residual), ASTM D 3174 (cenizas), ISO 562 (materia volátil), ASTM D 3172-13 (carbono fijo) y ASTM D 5865 (Capacidad calorífica bruta).

Microorganismos y medios

Del cepario del laboratorio de biominería y biohidrometalurgia de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, se tomó un aislado compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* proveniente del depósito de carbón de la mina "La Angostura" (Caicedo, 2008; Cardona, 2008), para corroborar la compatibilidad de la cepa escogida, se realizó una identificación bioquímica, descrita en el manual de Bergey Staley *et al.* (1994); y un cepa axénica de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (American Type Culture Collection 23270), conservados a 4 °C ± 1 °C, las cuales tuvieron una adaptación previa al proceso de biodesulfurización de carbón, bajo un protocolo preestablecido (Caicedo, 2008).

Biodepiritización del carbón

La preparación de los ensayos se hizo en erlenmeyers de 500 mL, a un volumen de 200 mL, empleando el medio de cultivo T&K modificado (0.5 g/L de (NH₄)₂SO₄, 0.5 g/L de KH₂PO₄, 0.5 g/L de MgSO₄ y FeSO₄·7H₂O al 33.33 % p/v), 10 % p/v de carbón y 10% v/v de inoculo (10⁷ - 10⁸ células/mL). El pH del medio se ajustó en 1,5 con ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1N. Las variables evaluadas fueron: (i) concentración inicial de hierro en solución: 200 mg/L (C1) y 1200 mg/L (C2), mediante la adición de sulfato ferroso; (ii) cultivo bacteriano: microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* (N) y la cepa ATCC 23270 (P). Los ensayos resultantes fueron: NC1, PC1, NC2, PC2. Cada ensayo se preparó por duplicado más un control negativo (abiótico) con medio nutritivo en condiciones estériles. Los experimentos fueron incubados a 30 °C ± 1 °C, con agitación continua a 180 rpm ± 2 rpm durante 12 días, tiempo en el cual los microorganismos alcanzaron la fase estacionaria.

Procedimientos analíticos

El monitoreo de los experimentos se realizó a partir de mediciones de Eh, empleando un equipo SCHOTT Handylab con un electrodo ORP Schott PT6880 de Ag/AgCl, y pH, utilizando equipo HACH HQ40d, con un electrodo IntelliCAL™ pH301. El recuento celular se realizó en una cámara de Neubauer. Adicionalmente, las suspensiones fueron analizadas en un espectrofotómetro marca GENESYS™ 10 UV de barrido, por el método colorimétrico o-fenantrolina (ASTM E394 - 09).

Resultados

Análisis químicos y mineralógicos de la muestra

La tabla 1 muestra los análisis próximos y de las formas de azufre presentes en el carbón. Este presentó un contenido de azufre total de 2.30%, del cual 1.06% corresponde a azufre pirítico. Mediante la aplicación de la norma ASTM D388 -12, para la clasificación de carbones por rango, se determinó que el carbón empleado es de tipo sub-bituminoso A.

Biodepiritización del carbón

Mediciones de pH y potencial redox (Eh)

El comportamiento del pH vs. Tiempo se muestra en la figura 1. En general, los primeros dos días del proceso se evidenció un aumento en los valores de pH, los bioensayos PC1 y PC2 alcanzaron mayores valores de pH (2,10 y 2,20 respectivamente), frente a los experimentos NC1: 1,90 y NC2: 2,05. Vale la pena mencionar que al adicionar una mayor concentración de sulfato ferroso inicial (1200 mg/L), se observaron mayores valores de pH, los primeros días. Entre el día dos y el día cuatro, la curva presenta una caída en los valores de todos los ensayos, especialmente en aquellos en los cuales se empleó una mayor concentración

de sulfato ferroso inicial (1200 mg/L), este comportamiento se evidenció tanto para el cultivo axénico (PC2: 1,80), como para el aislado bacteriano compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* (NC2: 1,76), tendencia que se mantuvo hasta finalizar el proceso. Vale la pena mencionar, que los ensayos en los cuales se utilizó el aislado bacteriano compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, presentaron los menores valores de pH en las dos concentraciones de sulfato ferroso estudiadas (NC1: 1,52 y NC2: 1,47), después de 12 días de experimentación.

Tabla 1. Análisis próximos y formas de azufre presentes en el carbón.

Análisis	Unidades	Resultados
Azufre orgánico	%	1.10
Azufre pirítico	%	1.06
Azufre sulfatos	%	0.14
Azufre total	%	2.30
Cenizas	%	5.50
Carbono fijo	%	40.10
Materia Volátil	%	40.20
Humedad residual	%	14.20
Poder calorífico - Base bruta	cal/g	5730

Por otra parte, los controles presentaron un aumento en los valores de pH los primeros dos días del proceso, sin embargo después del día dos, el pH se mantuvo sin cambios, finalizando el proceso con un pH cercano al inicial.

La figura 2 muestra el comportamiento del Eh vs. Tiempo. A nivel general, todos los bioensayos presentaron

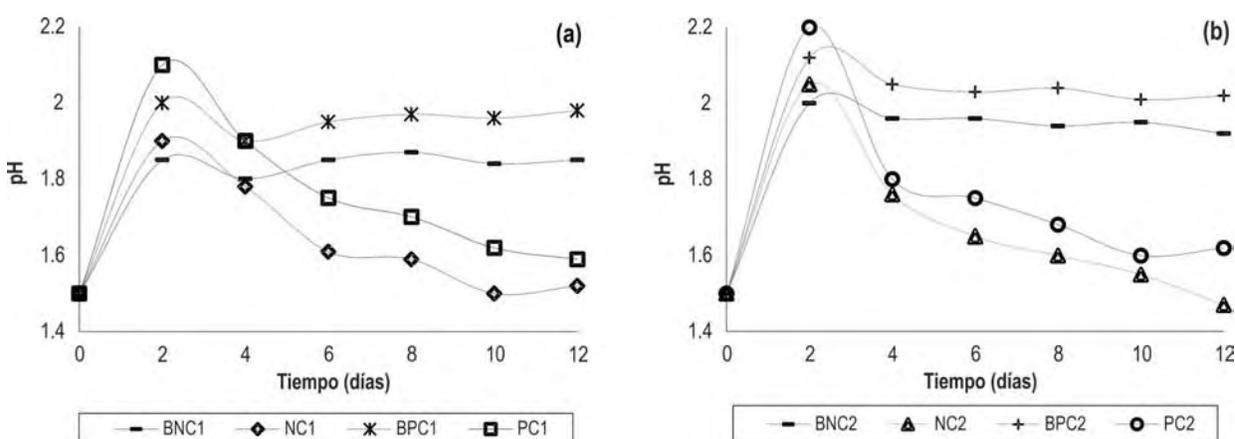


Figura 1. Comportamiento del pH vs. Tiempo. (a) hierro total: 200 mg/L (b) hierro total: 1200 mg/L. P: ATCC 23270, N: aislado bacteriano compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L, B: control negativo.

un continuo aumento en los valores del Eh a lo largo del proceso, alcanzando valores por encima de 560 mV. Cabe mencionar que los ensayos con mayor concentración de hierro total (1200mg/L) empezaron el proceso con menores valores de Eh (NC2: 350 mV PC2: 300 mV) en comparación con los ensayos NC1 y PC1 (390 mV y 400 mV respectivamente). Adicionalmente, se observó una pequeña caída en la velocidad de incremento del Eh (día 0 - 2) en los experimentos a los cuales se adicionó 1200 mg/L, siendo que esta tendencia se invirtió después del día cuatro, a partir del cual, estos ensayos mostraron altos valores de Eh. Vale la pena resaltar que tanto NC1 como NC2, alcanzaron los mayores valores de Eh (610 mV y 625 mV, respectivamente) en comparación con los ensayos PC1 (560 mV) y PC2 (580 mV) en los cuales se empleó la cepa ATCC 23270. Por otra parte, los ensayos abióticos se mantuvieron con una tendencia constante, alrededor de 400 mV en comparación con los ensayos bióticos durante el proceso.

Crecimiento bacteriano

La figura 3 muestra el logaritmo de la concentración celular vs. tiempo. En general, se observó un comportamiento similar, caracterizado por una fase lag los primeros dos días del proceso, seguido por un crecimiento exponencial o fase logarítmica, entre el día dos y el día cuatro, alcanzando posteriormente la fase estacionaria. En este sentido, los experimentos en los cuales se empleó una mayor concentración de sulfato ferroso inicial (NC2 y PC2) presentaron menor velocidad de crecimiento celular durante los primeros dos días del proceso, en relación con sus contrapartes de menor concentración (NC1 y PC1), lo cual es coherente con el comportamiento disímil del pH y Eh en el mismo periodo, siendo que después de esto, el ensayo NC2 alcanzó mayores tasas de crecimiento celular (6.3×10^8 células/

mL) en comparación con el cultivo axénico a las mismas condiciones (5.1×10^8 células/mL).

Hierro removido y pirita oxidada

La figura 4 muestra el cambio en la concentración de hierro en solución en el tiempo, para los tratamientos estudiados. Todos los ensayos presentaron una solubilización significativa de hierro a partir del cuarto día. Después de doce días de experimentación, los ensayos que utilizaron cepas nativas, NC1 (51.34%) y NC2 (60.45%), presentaron mayores porcentajes de lixiviación, en comparación con sus análogos en los cuales se empleó el cultivo axénico PC1 y PC2 (36.51% y 45.27% respectivamente).

La figura 5 muestra el histograma de pirita oxidada al finalizar el proceso. Se puede observar que los experimentos en los cuales se empleó el aislado bacteriano compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y una concentración de hierro inicial de 1200 mg/L, presentaron un mayor potencial oxidativo y obtuvieron los mejores resultados (NC2: 68%); en comparación con los ensayos en los cuales se utilizó el cultivo axénico ATCC 23270 (PC2: 52%) a las mismas condiciones. De manera análoga, los experimentos con bacterias compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y menores concentraciones de hierro ferroso inicial (200 mg/L) presentaron mayores porcentajes de pirita oxidada (NC1: 57%), mientras su contraparte PC1 solo alcanzó un 44% de oxidación del sulfuro metálico.

Discusión

Sulfato ferroso y la actividad oxidativa de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Según el proceso de biolixiviación de pirita en los cuales se emplea *Acidithiobacillus ferrooxidans* propuesto

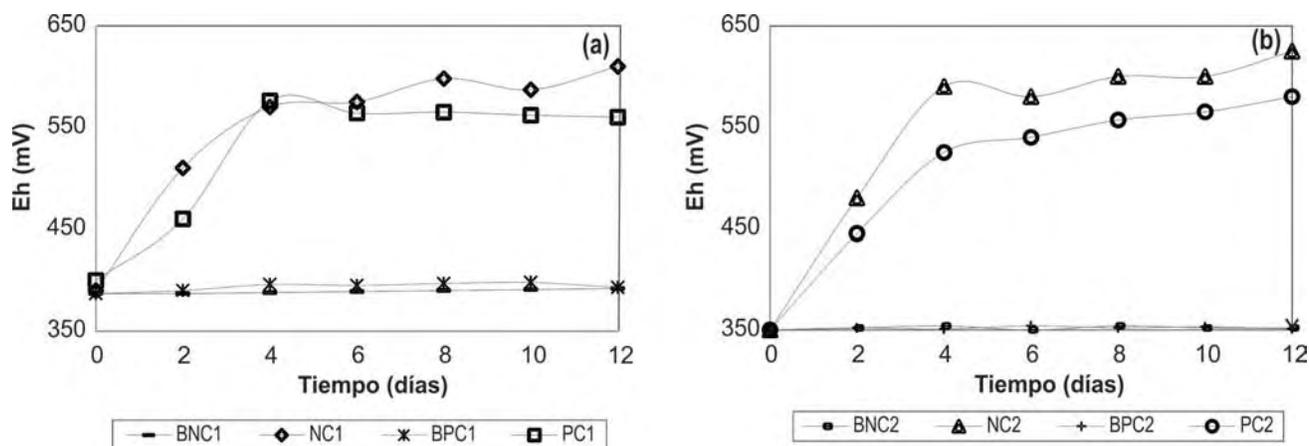


Figura 2. Comportamiento del Eh vs. Tiempo. (a) hierro total: 200 mg/L (b) hierro total: 1200 mg/L. P: ATCC 23270, N: aislado bacteriano compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L, B: control negativo.

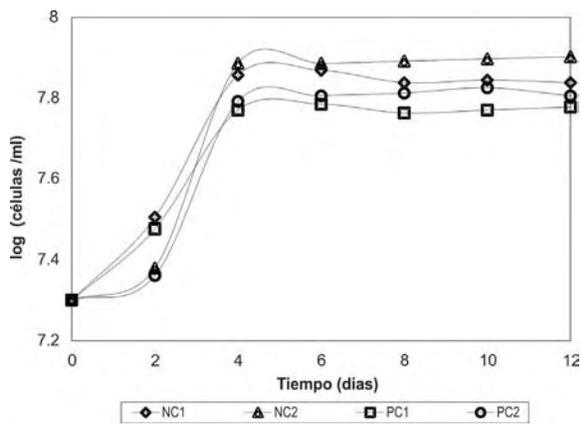


Figura 3. Concentración celular vs. Tiempo. (a) hierro total: 200 mg/L (b) hierro total: 1200 mg/L. P: ATCC 23270, N: aislado bacteriano compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L, B: control negativo.

por algunos autores (Daoud & Karamanev, 2006; Kargi, 1986; Sand *et al.*, 2001); el ácido (H^+) es considerado un factor necesario para la (re)generación del ion férrico (Fe^{3+}), responsable de la disolución de pirita. De esta manera, el mayor incremento en los valores de pH (figura 1) observado en los ensayos con mayores concentraciones de hierro (NC2 y PC2) pudo ser debido a un mayor consumo de iones H^+ ($2H^+$ por cada Fe^{2+}) (Blázquez *et al.*, 1993). Sin embargo, los ensayos abióticos también evidenciaron un aumento en los valores de pH durante este periodo, indicando que los agentes alcalinizantes presentes en la matriz del carbón también podrían influir sobre este efecto, lo cual coincide con lo reportado en investigaciones previas realizadas sobre carbones de la zona (Caicedo & Marquéz, 2011; Peláez *et al.*, 2013).

La posterior disminución de los valores de pH que se observó a partir del día dos, es una evidencia de producción de iones H^+ , producto tanto de la reacción

de hidrólisis de los iones férricos disueltos, como de la biooxidación de la pirita (Daoud & Karamanev, 2006). Así pues, podría sugerirse que la acidez del medio lixiviante, favorece la solubilidad y disminuye la precipitación de los iones Fe^{3+} , aumentando las tasas de oxidación de pirita y la eficiencia de proceso, debido probablemente a que si el agente químico oxidante se mantiene disponible en la solución por más tiempo, podría darse un mayor ataque oxidativo, permitiendo un incremento en las tasas de extracción del sulfuro metálico.

Vale la pena mencionar, que los microorganismos nativos evidenciaron una mayor disminución en el pH en comparación con el cultivo axénico, independientemente de la concentración de hierro ferroso adicionada a la solución. Esto se debió probablemente a que el aislado nativo logró una mejor adaptación previo al proceso de biodesulfurización, obteniendo una mayor población celular y por ende una mayor actividad oxidativa que le permite generar mayores cantidades de ácido para compensar el consumo de iones H^+ por parte de las bacterias durante el proceso. Esta ventaja podría estar relacionada con una capacidad inherente de los microorganismos asociada con el medio natural (drenaje ácido de una mina de carbón) del cual fueron aisladas.

Por otra parte, los resultados de potencial de óxido-reducción obtenidos por los experimentos bióticos realizados (figura 2), mostraron valores alrededor de los 600 mV, similar a otros procesos de biodesulfurización en suspensión (Caicedo & Marquéz, 2011). Podría decirse que los altos valores de Eh fueron debidos al incremento de la concentración inicial de sulfato ferroso, la cual contribuyó con el hecho de que los microorganismos incrementaran su metabolismo, aumentando la relación Fe^{3+}/Fe^{2+} en el medio lixiviante y generando un ambiente propicio para que se lleve a cabo la oxidación de la pirita (Meruane, 2002).

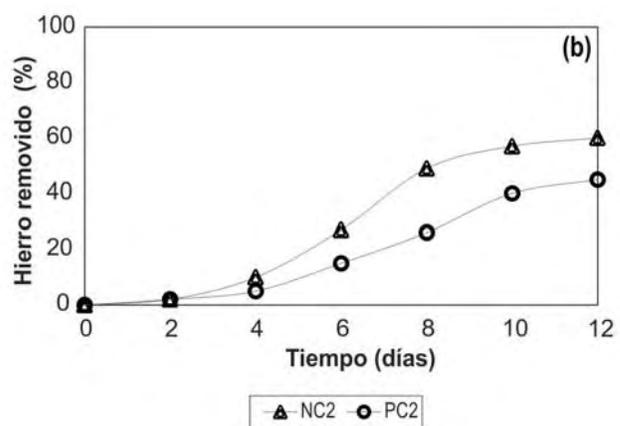
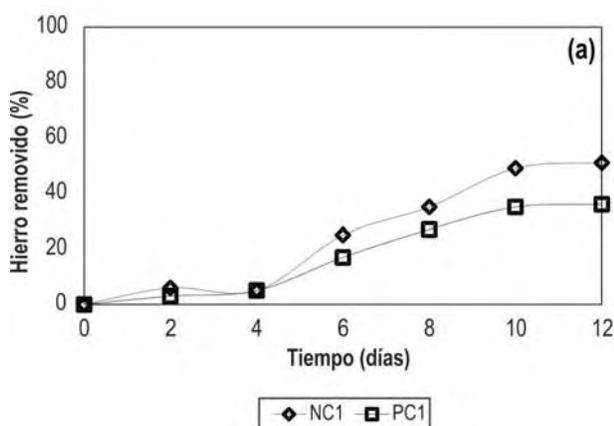


Figura 4. Porcentaje de hierro removido vs. Tiempo. (a) hierro total: 200 mg/L (b) hierro total: 1200 mg/L. P: ATCC 23270, N: aislado bacteriano compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, C1: 200 mg/L de Fe^{2+} , C2: 1200 mg/L, B: control negativo.

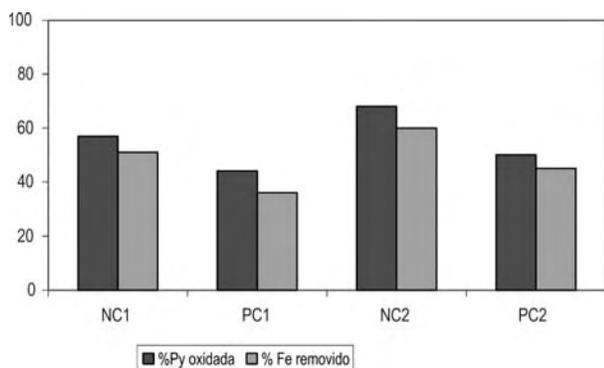


Figura 5. Porcentaje de pirita oxidada y solubilizada, variando la concentración de hierro total inicial. P: ATCC 23270, N: aislado bacteriano compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, C1: 200 mg/L, C2: 1200 mg/L, B: control negativo.

Adicionalmente, los mayores valores de Eh alcanzados por los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* (NC1 y NC2) indicaron que estos tuvieron una mayor actividad oxidativa en comparación con el cultivo axénico. Esto se debe probablemente a que mantuvieron una constante transferencia de electrones en el sistema, fundamentalmente en lo que se refiere a la regeneración de los iones férricos (Menadier, 2009). Una hipótesis que surge a partir de estos resultados es que el cultivo compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* puede contener además de esta bacteria otro tipo de microorganismo causante de este efecto (Boon, 2001).

Vale la pena mencionar que los valores de Eh iniciales están relacionados estrechamente con la concentración inicial de hierro total adicionada al sistema. De esta manera, los ensayos a los cuales se empleó una mayor concentración de hierro (NC2 y PC2) mostraron valores de Eh iniciales bajos en comparación con su contraparte de menor concentración, esto es debido posiblemente a que al iniciar el proceso, la mayor parte del hierro en solución está presente como Fe^{2+} lo cual generó una disminución en la relación Fe^{3+}/Fe^{2+} del sistema. En este sentido, al comparar los resultados obtenidos de pH y Eh durante el periodo inicial (día cero a dos), es posible notar que el pH de los ensayos a los cuales se utilizó una mayor concentración de hierro inicial es mayor por lo que se podría inferir que los microorganismos se encuentran activos o preparando la maquinaria metabólica disponible para llevar a cabo el proceso, esta afirmación toma sentido si se tiene en cuenta que los experimentos en los cuales se empleó una menor concentración de hierro inicial mostraron un comportamiento semejante al obtenido en la última etapa de adaptación (datos no mostrados).

Respecto al crecimiento celular, la fase *lag* evidenciada los primeros días del proceso (figura 3), podría estar relacionada con un atrapamiento de las bacterias en el mineral o con la adición de los iones Fe^{2+} al siste-

ma. El rápido incremento que exhibió la concentración celular en días posteriores, sugiere que las bacterias prosperaron fácilmente en las condiciones impuestas e indica una respuesta favorable al proceso.

Cabe resaltar, que los resultados obtenidos no indicaron la concentración real de células, debido a que se cuantificó solamente la población de células planctónicas y no se tuvo en cuenta la influencia de las bacterias sésiles. Sin embargo, estudios previos indican que al adicionar iones Fe^{2+} al medio se disminuye considerablemente la hidrofobicidad, relacionada con la adhesión de las células (mecanismo indirecto de contacto) a los sustratos insolubles tales como pirita (Deveci, 2004).

Las tasas de crecimiento celular alcanzadas por los bioensayos podrían estar asociadas con la disponibilidad de los iones Fe^{2+} en la solución, de esta manera, al existir una mayor cantidad de sustrato soluble, las bacterias obtienen la energía necesaria para aumentar la población celular. Este comportamiento es coherente con el comportamiento de los demás parámetros evaluados (pH, Eh). Adicionalmente, se observó que adicionar concentraciones iniciales de hierro ferroso propicia la división celular y evita la limitación del crecimiento por falta de sustrato (Bosecker, 1997; Kargi, 1986).

Vale la pena mencionar, que los ensayos NC1 y NC2 lograron las más altas poblaciones celulares, en comparación con sus análogos realizados con la cepa ATCC 23270. Este comportamiento puede estar relacionado con el hecho de que el aislado bacteriano compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* se adaptó y prosperó fácilmente en las condiciones impuestas, y/o estar asociado con la coexistencia de otro tipo de microorganismos de morfología similar, las cuales se suman al conteo total de células.

El comportamiento estacionario que se evidencia a partir del día cuatro pudo ser consecuencia del agotamiento del sustrato soluble adicionado al sistema, así pues, la pirita es el único sustrato disponible, pero obtener la energía a partir de este es un proceso de cinética lenta, que frena el aumento exponencial del crecimiento celular (Bozdemir et al., 1996). Vale la pena resaltar que a pesar de que la población celular se encontró en fase estacionaria, la transformación de los iones ferrosos en el sistema se mantiene en todos los bioensayos de acuerdo con las curvas de Eh, pH y las medidas de hierro en solución.

En relación con el porcentaje de hierro lixiviado y pirita oxidada (figuras 4 y 5), los ensayos en donde se utilizaron microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* presentaron una solubilización significativa de hierro. De esta manera es posible inferir que el proceso de desulfurización depende principalmente de la actividad oxidativa de las bacterias empleadas, esta afirmación adquiere validez si se tiene

en cuenta que los experimentos realizados a las mismas condiciones con la cepa axénica (ATCC 23270) mostraron una menor eficiencia. Este hecho podría ser explicado probablemente porque las células compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* transformaron rápidamente los iones ferrosos y mantuvieron las condiciones favorables durante el proceso (bajo valores de pH, altos valores de Eh), lo cual pudo ser la causa del aumento en las tasas de remoción de pirita e impidió la precipitación de los productos de la oxidación respectivamente.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* mostraron una mayor eficiencia del proceso de biodesulfurización. Una primera hipótesis que surge a partir de estos resultados es que esta ventaja está asociada posiblemente con una capacidad intrínseca -probablemente funcional- referida a un metabolismo hierro oxidante más eficiente, sugiriendo una mayor expresión de proteínas y genes (ej. *Iro* y *rusA*), que jugaron un papel central en la cadena de transferencia electrónica de Fe^{2+} a O_2 . El mecanismo biológico que subyace a esta diferencia no es objetivo de este estudio, pero probablemente este asociado a un polimorfismo genotípico de estas células, dependiente del ambiente de evolución que les confiere una ventaja sobre el cultivo axénico (Bird, 2011). Adicionalmente, una segunda hipótesis indica que este comportamiento (mayor actividad oxidativa) podría estar relacionado con un trabajo sinérgico asociado a otro tipo de bacterias quimiolitotróficas presentes en el cultivo o a bacterias mutantes de la misma especie, las cuales contribuyen no solo con la disolución del sulfuro metálico sino que permiten una mayor disminución de los valores del pH y un incremento significativo de los valores de potencial redox (Kargi, 1986). Esta hipótesis resulta probable ya que se debe tener en cuenta que aunque se llevaron a cabo pruebas bioquímicas para corroborar la compatibilidad de la cepa escogida (*Acidithiobacillus ferrooxidans*), cualquier otra colonia de bacterias de metabolismo similar (oxidantes de hierro y azufre) podría estar presente. Finalmente, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el mecanismo indirecto de no contacto es el más probable para la disolución del sulfuro de hierro, debido posiblemente a que la biolixiviación de metales sulfurados insolubles en ácido esta exclusivamente basado en el ataque oxidativo de los iones Fe^{3+} (Sand et al., 2001).

Conclusiones

Los ensayos en los cuales se empleó microorganismos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* presentaron mayor eficiencia en comparación con los experimentos en los cuales se utilizó la cepa axénica (ATCC 23270), ya que obtuvieron el mayor porcentaje de biolixiviación de hierro en solución en las dos concentraciones de hierro inicial evaluadas (200 mg/L y 1200mg/L), alcanzando 68% y 57% de oxidación de

pirita respectivamente, después de 12 días de proceso. Esto indica que la adición de los iones ferrosos al medio aumenta la actividad oxidativa de las bacterias y mejora significativamente la oxidación de la pirita. Esto constituye la base principal de este estudio y se considera una buena alternativa a la hora de optimizar el proceso biológico de extracción de azufre inorgánico del carbón.

Agradecimientos

A la empresa cementera ARGOS S.A, a COLCIENCIAS y al grupo de mineralogía aplicada y bioprocesos (GMAB) de la Universidad Nacional de Colombia - sede Medellín, donde se llevó a cabo la investigación.

Referencias bibliográficas

- Aller, A., Martínez, O., de Linaje, J. A., Méndez, R., & Morán, A. (2001). BIODESULPHURIZATION OF COAL BY MICROORGANISMS ISOLATED FROM THE COAL ITSELF. *Fuel Processing Technology*, 69(1), 45-57.
- Bird, L. J., Bonnefoy, V., & Newman, D. K. (2011). Bioenergetic challenges of microbial iron metabolisms. *Trends in Microbiology*, 19(7), 330-340.
- Boon, M. (2001). The mechanism of "direct" and "indirect" bacterial oxidation of sulphide minerals. *Hydrometallurgy*, 62(1), 67-70.
- Bosecker, K. (1997). Bioleaching: Metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 20(3-4), 591-604.
- Caicedo, G. (2008). Biodesulfurización de carbón de la zona Río Guachinté - Río Aznázú Valle Del Cauca y Cauca en biorreactores de columna, utilizando microorganismos nativos (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- Caicedo, G., & Marquéz, M. (2011). Influencia de la concentración de hierro y pH iniciales en un proceso de biodesulfurización de carbón - ensayos a nivel de laboratorio. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 199-209.
- Cara, J., Carballo, M., Morán, A., Bonilla, D., Escolano, O., & García Frutos, F. (2005). BIODESULPHURISATION OF HIGH SULPHUR COAL BY HEAP LEACHING. *Fuel*, 84, 1905-1910.
- Cardona, C. (2008). Mineralogía del proceso de biodesulfurización de carbones provenientes de la zona del río Guachinté - río Aznázú (Valle del cauca y cauca), (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Medellín. Colombia.
- Chou, C. (2012). Sulfur in coals: A review of geochemistry and origins. *International Journal of Coal Geology*, 100, 1-13.
- Daoud, J., & Karamanev, D. (2006). Formation of jarosite during Fe^{2+} oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Minerals Engineering*, 19, 960-967.
- Harnett, K., Göksel, A., Kock, D., Klock, J. H., Gehrke, T., & Sand, W. (2006). Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 83(1-4), 245-254.

- He, Z., Yin, Z., Wang, X., Zhong, H., & Sun, W. (2012). Microbial community changes during the process of pyrite bioleaching. *Hydrometallurgy*, 125-126(3), 81-89.
- Johnson, D., & Hallberg, K. (2003). The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology*, 154(7), 466-473.
- Juszczak, A., Domka, F., Kozłowski, M., & Wachowska, H. (1995). Microbial desulfurization of coal with *Thiobacillus ferrooxidans* bacteria. *Fuel*, 74(5), 725-728.
- León, E. (2006). La importancia del carbón mineral en el desarrollo. *Revista Del Instituto de Investigaciones FIGMMC*, 9(18), 91-97.
- May, N., Ralph, D. E., & Hansford, G. S. (1997). Dynamic redox potential measurement for determining the ferric leach kinetics of pyrite. *Minerals Engineering*, 10(11), 1279-1290.
- Menadier, A. (2009). Biolixiviación de piritas por *Acidithiobacillus ferrooxidans* y cepas nativas (tesis pregrado). Universidad de Chile, Santiago de Chile. Chile.
- Meruane, G. (2002). Oxidación bacteriana de sulfato ferroso con *Acidithiobacillus ferrooxidans* (tesis doctoral). Universidad de Chile, Santiago de Chile. Chile.
- Peláez, H., Prada, M., Caicedo, G., Moreno, C., & Marquéz, M. (2013). Influencia de la relación inicial de Fe^{2+}/Fe^{3+} , en un proceso de biodesulfurización de carbones en suspensión. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(2), 211-217.
- Prayuenyong, P. (2002). Coal biodesulfurization processes. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 24, 493-507.
- Rawlings, D. (2001). Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans* and other mesophilic, acidophilic, chemolithotrophic, iron- or sulfur-oxidizing bacteria. *Hydrometallurgy*, 59(2-3), 187-201.
- Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P., & Schippers, A. (2001). (Bio)chemistry of bacterial leaching - direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*, 59(2-3), 159-175.
- Zhang, L., Qiu, G., Hu, Y., Sun, X., Li, J., & Hu, G. (2008). Bioleaching of pyrite by *A. ferrooxidans* and *L. ferriphilum*. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 18(6), 1415-1420.

Efecto de las PGPB sobre el crecimiento *Pennisetum clandestinum* bajo condiciones de estrés salino

PGPB effect on the growth *Pennisetum clandestinum* under salt stress

Diana Beatriz Sánchez López^{*}, Jazmín Vanessa Pérez Pazos^{**},
Hilda Adriana David Hinestroza^{***}

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.50413

Resumen

Esta investigación tuvo como objetivo el aislamiento y caracterización de bacterias con potencial para promover el crecimiento del pasto *Pennisetum clandestinum* en suelos salinos simulados. De muestras de suelo rizosférico de *P. clandestinum* se aislaron 92 bacterias Gram positivas, diez aislados crecieron en agar nutritivo suplementado con NaCl (2,578 M). Los aislados se evaluaron bajo condiciones de invernadero; las cepas identificadas como KISA 34 y KISA 71 fueron seleccionadas como las mejores con base a la prueba estadística de Dunnet ($p \leq 0,05$) y fueron identificadas molecularmente como *Bacillus amyloliquefaciens* KISA 34 y *Bacillus subtilis* KISA 71. Estas cepas tienen la capacidad de producir; amonio, exopolisacáridos y celulosa, y tanto en presencia como ausencia de NaCl, produjeron índoles totales y solubilización de fósforo. La evaluación de las cepas en invernadero evidenció que el T6 - KISA 34 + KISA 71+ 25 % (Roca Fosfórica RF) con respecto al T2- testigo químico completo incrementaron de manera significativa la biomasa y el desarrollo de la planta ($p \leq 0.05$). Los resultados de esta investigación demostraron que las cepas aisladas tienen la capacidad de crecer en suelos salinos conservando sus características como promotoras de crecimiento vegetal con efectos positivos sobre *P. clandestinum*.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, biofertilizantes, salinidad, solubilización de fósforo.

Abstract

This research aims the isolation and characterization of bacteria with potential to promote the growth of grass *Pennisetum clandestinum* in simulated saline soils. 92 Gram positive bacteria were isolated from Rhizosphere soil samples of *P. clandestinum*. Ten isolated bacteria grew on nutrient agar supplemented with NaCl (2.578 M). Isolates were evaluated under greenhouse conditions; the strains identified as KISA 34 and KISA 71 were selected as the best based on the statistical test of Dunnet ($p \leq 0.05$) and were identified *Bacillus amyloliquefaciens* KISA 34 and *Bacillus subtilis* KISA 71. These strains have the ability to produce ammonium, exopolysaccharides and cellulose, both in absence and presence of NaCl. The strains produced indoles and phosphorus solubilization. The evaluation of strains in greenhouse showed that the T6 - KISA 34 + KISA 71+ 25 % (phosphate rock RF) significantly increased biomass and plant development ($p \leq 0.05$) compared with T2 - full fertilization. The results of this research showed that isolates have the ability to grow in saline soils retaining its characteristics as promoting plant growth with positive effects on *P. clandestinum*.

Key words: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, biofertilizer, salinity, phosphorus solubilization.

Recibido: octubre 15 de 2015

Aprobado: mayo 4 de 2016

Introducción

El pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) es nativo de las praderas de África central (Muscolo et al., 2003; Muscolo et al., 2013), y actualmente es la gramínea

predominante en los sistemas de producción bovina del trópico alto (Carulla et al., 2004), esto se debe a sus características nutritivas y fisiológicas: digestibilidad, alto contenido de proteína y palatabilidad (Ma-

* M.Sc. Ciencias Biológicas. Centro de investigación Turipaná. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). km 13 vía Montería-Cereté, Colombia. Telephone +57(1) 4227300 Ext. 2249. E-mail correspondencia: dbsanchez@corpoica.org.co.

** B.Sc Bióloga. Centro de investigación Turipaná. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). km 13 vía Montería-Cereté, Colombia. Telephone +57(1) 4227300 Ext. 2249. jyperez@corpoica.org.co.

*** M.Sc. Nutrición de Rumiantes. Centro de investigación Turipaná. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). km 13 vía Montería -Cereté, Colombia. adavid@corpoica.org.co.

rais et al., 1992; Muscolo et al., 2003; Muscolo et al., 2013), rusticidad, alta capacidad de adaptación, tolerancia moderada a estrés hídrico y a la baja disponibilidad de nutrientes (Rincón et al., 1998). Crece desde el nivel del mar hasta los 3.500 m.s.n.m., en un rango de temperatura y precipitación entre 18 a 30 °C y 600 a 700 mm/año. Adicionalmente, su sistema radicular lo convierte en excelente colonizador y estabilizador de suelos (Marais, 2001; Muscolo et al., 2003; Muscolo et al., 2013), por lo que a menudo es utilizado en terrenos erosionados (Marais et al., 1992).

La salinización de los suelos es reconocida como la principal amenaza de los recursos medioambientales y afecta entre el 7 a 10 % de la extensión continental (Upadhyay et al., 2011). Un suelo es considerado salino cuando la concentración de iones interfiere el crecimiento de especies de interés agrícola y alcanza una conductividad eléctrica $>4 \text{ dS m}^{-1}$ (aproximadamente 36 mM de NaCl), determinados en la pasta del suelo a 25 °C (Bui, 2013). La presencia de sales en el suelo es de origen pedogénico (meteorización) o antrópico (agua de irrigación o fertilización) y se exagera cuando las precipitaciones son insuficientes para lixiviar los iones del perfil del suelo, o cuando las tasas de evaporación son altas (Parida & Das, 2005; Bui, 2013; Shrivastava & Kumar, 2014).

La salinidad disminuye la producción agrícola en la mayoría de los cultivos por la afectación de las propiedades físico-químicas del suelo y balance ecológico del área cultivada (Upadhyay et al., 2011; Shrivastava & Kumar, 2014). Bajos niveles de salinidad $< 4 \text{ dS m}^{-1}$ inducen a estrés fisiológico porque sus iones, producen toxicidad estrés osmótico, oxidativo y deficiencia de nutrientes (N, Ca, K, P, Fe, Zn) que limitan la toma de nutrientes del suelo; la salinidad también afecta la fotosíntesis, debido a la reducción de área foliar, contenido de clorofila, conductancia estomática y, en menor medida, la eficiencia del fotosistema II. Lo anterior se ve reflejado en una disminución de la germinación, crecimiento vegetativo y el desarrollo reproductivo en diferentes cultivos (Parida & Das, 2005; Bui, 2013; Shrivastava & Kumar, 2014; Pompeiano et al., 2014).

Particularmente, el pasto Kikuyo puede ser muy sensible a las deficiencias de magnesio, fósforo, potasio, azufre, hierro, cobre y manganeso, siendo el fósforo de especial importancia para el establecimiento de las pasturas (Marais, 2001). Por lo que las condiciones de salinidad podrían disminuir su desempeño.

Debido a la problemática que la salinidad representa, es necesario re-examinar el uso de fertilizantes y plaguicidas de síntesis química relacionados con la concentración de sales en el suelo y desarrollar una agricultura sustentable, clave para el planteamiento de estrategias alternativas y complementarias (Ali et al., 2014; Goswami et al., 2014). Entre estas alternativas se destaca el uso de inoculantes microbianos, conside-

rados como una tecnología limpia y alineada con los principios de la agricultura sustentable.

Numerosas bacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPB) tienen la capacidad de colonizar la rizósfera y endorizósfera de las plantas y beneficiarla directa e indirectamente; bien sea por su comportamiento como halófilas cuando en el suelo existen condiciones de salinidad (Glick, 2004; Shrivastava & Kumar, 2014; Goswami et al., 2014). De esta forma, las plantas se ven beneficiadas por el aumento de la disponibilidad de nutrientes originados por la actividad de las PGPB, así como por la producción de fitohormonas y reducción en los niveles de producción de etileno por medio de regulación enzimática (Ali et al., 2014; Goswami et al., 2014).

En este contexto, esta investigación tuvo como objetivo el aislamiento y caracterización de bacterias con potencial para promover el crecimiento del pasto Kikuyo en suelos salinos simulados.

Materiales y métodos

Condiciones Experimentales. Este estudio se realizó en el año 2013 y 2014, en el centro de Investigación Tibaitatá de CORPOICA ubicado en el municipio de Mosquera Cundinamarca (Colombia) a una altura de 2543 m.snm. Se localiza en las coordenadas geográficas a 4°41' 43" de latitud norte y 74° 12' 30" de latitud oeste.

Aislamiento y selección de bacterias Gram positivas halófilas. Se tomaron y tamizaron cinco muestras de suelo rizosférico asociado a *Pennisetum clandestinum* a una profundidad de 20 cm. Se pesaron, diluyeron y agitaron 10 g de suelo por muestra en 90 ml de solución de NaCl estéril al 0,85 %, durante 15 min a 150 rpm. Se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-7} y se inocularon 0,1 ml en cajas de Petri con medio nutritivo (g/l⁻¹: glucosa 0,5; extracto de levadura 0,5; peptona 0,5; caseína 0,5; almidón 0,5; K₂HPO₄ 0,30; MgSO₄ 0,05; agar-agar 17,0 pH: 7) suplementado con 0,5 M de NaCl.

Determinación del efecto de diferentes concentraciones NaCl sobre el crecimiento bacteriano. Los aislamientos de bacterias Gram positivas, procedentes de la rizósfera de pasto *P. clandestinum*, fueron sembrados en agar nutritivo con diferentes concentraciones de NaCl (0,85 M; 1,712 M y 2,578 M).

Evaluación preliminar en invernadero de bacterias Gram positivas halófilas, bajo condiciones de invernadero. Se empleó un diseño completamente al azar con 5 repeticiones por tratamiento donde T0: testigo absoluto no salino, T1: testigo salino, T2: KISA 7, T3: KISA 18, T4: KISA 26, T5: KISA 34, T6: KISA 45, T7: KISA 46, T8: KISA 53, T9: KISA 58, T10: KISA 71, T11: KISA 80. Cada una de las siglas representa un aislamiento de bacterias Gram positivas halófilas. Estolones de *P. clandestinum* se sumergieron de acuerdo al tra-

tamiento correspondiente en una suspensión celular de 1×10^8 UFC ml^{-1} en caldo CASO[®] durante 30 min y posteriormente se sembraron en materas con 400 g de suelo con una conductividad eléctrica final para todos los tratamientos de $2,46 \text{ dSm}^{-1}$, excepto el control absoluto T0. Cada tratamiento fue inoculado con 5 ml de suspensión celular con una concentración de 1×10^8 UFC ml^{-1} en medio nutritivo 15 días después de la siembra. El experimento tuvo una duración de 20 días y las variables evaluadas fueron: peso seco de la parte aérea (g) y raíz (g).

Caracterización de los aislados seleccionados

Caracterización molecular. Se realizó mediante la amplificación y secuenciación de los genes ARNr 16S y *rpoB*. Para esto, se procedió a la extracción de ADN de cada una de las cepas mediante la lisis directa a partir de una colonia procedente de cultivo de 24 h. Se realizaron las PCR siguiendo las instrucciones del fabricante, mediante el Kit PCR Master Mix (ThermoScientific) y usando el set de primers 1492R (5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3') y 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') para el gen de 16S y *rpoB*1698f (59-AACATCGGTTTGATCAAC-3) y *rpoB*2041r (59-CGT-TGCATGTTGGTACCCAT-3) para el gen de *rpoB*.

La PCR para el ARNr 16S se realizó con el siguiente programa: una fase de denaturación inicial a 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 45 s, 55°C por 45 s y 72°C por 1.5 min y una extensión final a 72°C por 10 min. Para *rpoB*, denaturación a 94°C por 5 min, 25 ciclos de 94°C por 30 s, 50°C por 1.5 min y 72°C por 10 min, seguido por una extensión final a 72°C por 10 min.

Los productos de PCR se enviaron para su secuenciación. Las secuencias obtenidas se limpiaron y ensamblaron en una secuencia consenso, la que fue alineada con la secuencias de la base de datos GenBank del NCBI mediante la herramienta BLASTn.

Determinación de la actividad promotora de crecimiento en plantas (PGPB). La determinación cuantitativa de solubilización de fósforo se realizó en medio SRS modificado con roca fosfórica al 0.5 % como fuente de fósforo (gl^{-1} : glucosa 10, extracto de levadura 0,5; $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ 0,5; KCl 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,004; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2; pH: 7,2) por 5 días a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ a 150 rpm, la medición y lectura se realizó mediante la técnica de azul de fosfomolibdeno a una absorbancia de 712 nm (Fiske & Subbarow, 1925).

La producción de índoles totales se evaluó mediante el ensayo colorimétrico descrito por Glickmann y Desaux (1995). Para esto se empleó el medio de cultivo K-lactato suplementado con triptófano a 100 mg l^{-1} (Sánchez *et al.*, 2012) incubándose los cultivos durante 72 h a 150 rpm en la oscuridad. Para la lectura se empleó el reactivo de Salkowsky ($\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12 gl^{-1} en H_2SO_4 7,9M) en una relación 1:1 con la suspensión

bacteriana, dejándose reaccionar durante 30 min en oscuridad. La lectura de absorbancia se realizó a 450 nm en un espectrofotómetro ThermoSpectronic modelo Genesys 10.

Para la evaluación de la producción de NH_3 se inocularon los aislamientos en caldo nutritivo y se incubaron por un período de 24 h a 30°C . Al sobrenadante se le adicionó una solución de fenol/nitroprusiato y una solución de hidróxido de sodio/hipoclorito de sodio en relación 1:1 y se dejó reaccionar por 30 min a 60°C la lectura se realizó a 630 nm (Chaney & Marbach, 1962).

La evaluación de la actividad celulolítica se llevó a cabo de forma semicuantitativa; se utilizó el medio de cultivo carboximetilcelulosa (Lizarazo & Gomez, 2015). Se realizó una siembra de 50 μl de suspensión bacteriana en NaCl al 0,85% ($\text{OD}_{600} = 0,50$) en cajas de Petri y se incubó durante 48 h a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Transcurrido ese período, se determinó el índice de hidrólisis (IH) en placas con rojo Congo 1 % y HCl 0,1 M (Teather & Wood, 1982). Para determinar la producción de exopolisacáridos (EPS) 1 ml de cultivo bacteriano ($\text{OD}_{600} = 0,50$) se mezcló con 40 μl EDTA (0,26 M) y 20 μl NaCl (5,0 M) y se centrifugó a 14,800 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y adicionó 1 ml de etanol helado. Posteriormente se centrifugó durante 10 min a 14,800 rpm. El pellet se resuspendió en agua destilada. Se tomaron 0,29 μl y mezclaron con fenol (5 %) y ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente se estabilizó la muestra durante 10 min en baño termostático a 30°C . Se realizó la lectura a 490 nm (Dubois *et al.*, 1956).

La actividad de la ACC deaminasa se determinó mediante la medición de la cantidad α -cetobutirato producido a partir de la escisión de ACC (Penrose & Glick, 2003). Para ello las bacterias se cultivaron en caldo Caso[®] (caldo peptona de caseína-peptona de harina de soya) durante la noche a 30°C . El sedimento celular se transfirió a un medio mínimo con sal DFmM ACC-desaminasa como única fuente de nitrógeno. Cuando el crecimiento alcanzó la fase logarítmica tardía (es decir, $\text{DO}_{600} = 1,00$), se lavó el pellet dos veces con 0,1 M de Tris-HCl, pH 7,6 y pH 8,5 respectivamente. Se añadió tolueno a la suspensión de células y luego se leyó la absorbancia a 540 nm.

Producción de índoles y solubilización de fósforo bajo condiciones de estrés salino in vitro de los aislados seleccionados

Caracterización de los aislados seleccionados bajo condiciones de estrés salino in vitro

Con el fin de comparar los posibles cambios fenotípicos de las bacterias bajo estrés salino se emplearon tres concentraciones de NaCl (0,58 M; 0,24 M y 0,12 M). Las actividades producción de índoles totales y solubilización de fósforo fueron evaluadas de acuerdo a

las metodologías establecidas en la caracterización de actividades como PGPB.

Evaluación en invernadero de bacterias Gram positivas seleccionadas sobre el crecimiento de *P. clandestinum* bajo condiciones de estrés salino

Se empleó un diseño completamente al azar con seis tratamientos y 7 réplicas por tratamiento. Los tratamientos fueron los siguientes: T0: testigo absoluto sin sal ni fertilización, T1: testigo sin fertilización con sal, T2: fertilización química + 100 % roca fosfórica (RF), T3: fertilización química +25 %RF, T4: KISA 34 + 25 %RF, T5: KISA 71 + 25 %RF, T6: KISA 34 + KISA 71 +25 % RF.

Las cepas KISA 34 y KISA 71 se reactivaron en caldo CASO®. Los estolones de *P. clandestinum* se sumergieron de acuerdo al tratamiento correspondiente en una suspensión celular de 1×10^8 UFC ml^{-1} en caldo CASO® durante 30 min y se transfirieron a materas con capacidad de 400 g para su pre-germinación durante 25 días. Luego del tiempo de pre-germinación, los estolones se sembraron en bolsas con capacidad de 4,5 kg, en las cuales el suelo se ajustó con NaCl a una conductividad eléctrica inicial de $3,81 \text{ dS m}^{-1}$ para todos los tratamientos. Posteriormente cada tratamiento se inoculó con 5 ml de la suspensión celular correspondiente en caldo CASO® con una concentración de 1×10^8 UFC ml^{-1} .

La fertilización química se realizó con urea (279 mg), KCl (214 mg), MgSO_4 (150 mg), CaSO_4 (150 mg), MnSO_4 (150 mg) ZnSO_4 (28,6 mg), Borax (7 mg) teniendo en cuenta el análisis químico del suelo (11,06% MO; (mg kg^{-1}) 4,08 P; 0,77 K; 0,63 Mg; 1,29 Cmol kg^{-1} Ca; 1,25 dS m^{-1} y pH:5,04). La conductividad eléctrica final del suelo para todos los tratamientos al finalizar el ensayo fue de $2,68 \text{ dS m}^{-1}$. La determinación de fósforo soluble en suelo PO_4 (mg kg^{-1}) inicial fue de 0,17 según la metodología de García (1986). La roca fosfórica (RF) empleada se obtuvo en Pesca-Boyacá (Colombia) con la siguiente composición: 30 % P_2O_5 ; 40 % Ca; 12 % Si; 0,1 % Mg; 40 ppm Mn; 30 ppm Cu; 10 ppm Mo; 300 ppm Zn y un 3 % de humedad.

Al experimento se le realizaron 2 repeticiones. Para cada experimento 20 días después de la siembra se midió la altura y longitud radical y se determinó el peso seco aéreo y radicular.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando software SPSS 22.00 para Windows. Estos datos se sometieron a evaluación estadística para determinación de normalidad mediante el tests de Shapiro-Wilk y para homogeneidad de varianzas la prueba de Levene's. Para datos paramétricos se aplicó análisis de varianzas (ANOVA) y prueba de Dunnet y Tukey HSD con 95 % de

confianza y para no paramétricos la prueba de Kruskal-Wallis.

Resultados y discusión

Aislamiento y selección de bacterias Gram positivas con potencial PGPB y halófilas

De las muestras de suelo rizosférico se aislaron 92 bacterias Gram positivas, de las cuales solo 10 crecieron en agar nutritivo suplementado con NaCl (2,578 M).

Los diez aislados seleccionados se evaluaron en invernadero; los resultados obtenidos indican que dos de los aislados presentaron los mejores resultados con base a la prueba estadística de Dunnet ($p \leq 0,05$). Para el peso seco de la parte aérea se presentaron incrementos de un 68 % y 65 % al utilizar las cepas KISA 34, KISA 71 con respecto al testigo salino; para la variable de peso seco de la raíz se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con el testigo salino presentado mejores resultados los tratamientos KISA 34 y KISA 71 con un aumento en un 26 % y 59 % respectivamente.

Cabe resaltar que las bacterias evaluadas en este experimento soportan concentraciones de NaCl de 200 mM, lo que posiblemente permitió una actividad de promoción de crecimiento reflejada en el peso seco de la parte aérea y radicular de la planta.

Si bien Muscolo *et al.* (2003) informaron que el pasto *P. clandestinum* tiene una amplia capacidad de adaptación a condiciones de estrés salino y su crecimiento es óptimo hasta una concentración de 100 mM; también demostraron que después de una exposición de 15 días a concentraciones de NaCl de 150 mM a 200 mM, la planta, en su parte aérea y radicular se ve afectada. Esto coincide con lo observado en las plantas control de este ensayo efecto que fue mitigado por la inoculación bacteriana.

Caracterización de las cepas seleccionadas

Los aislamientos se identificaron como *Bacillus amyloliquefaciens* KISA 34 con un 94 % de identidad a la cepa con número de accesoión CP002927.1 del Genbank y *Bacillus subtilis* KISA 71 con un 100 % de identidad a la cepa con número de accesoión CP013654.1 del Genbank.

Diversas cepas de *Bacillus* sp., han sido reconocidas por su capacidad para mejorar la disponibilidad de nutrientes en el suelo y promover el crecimiento vegetal (Gül *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010; Umashankar *et al.*, 2012). Se destacan además por tolerar las condiciones de estrés abiótico en el suelo y colonizar eficientemente la rizósfera de las plantas de interés (Saharan & Nehra, 2011).

Nautiyal *et al.* (2013) estudiaron una cepa de *B. amyloliquefaciens* con capacidad de tolerar concentraciones

entre 50 – 100 mM de NaCl sin presentar cambios en sus poblaciones; estas se redujeron significativamente cuando la concentración se incrementó hasta 1000 mM; sin embargo algunas alcanzan a tolerar una concentraciones mayores de 2500 mM. Estos resultados podrían estar relacionados con la capacidad de esta cepa para producir prolina como osmorregulador en condiciones de estrés por salinidad (Nautiyal *et al.*, 2013).

Goswami *et al.* (2014) encontraron que plantas tratadas con 50 mM NaCl e inoculadas con la cepa de *B. licheniformis* mostraron un incremento entre el 15 % y el 28 % en biomasa, mientras que Upadhyay *et al.* (2011) encontraron incrementos de hasta un 226 % en la biomasa seca de plantas sometidas a estrés salino cuando estas fueron inoculadas con cepas de *Bacillus* sp.

Los aislados KISA 34 Y KISA 71 tienen la capacidad de solubilizar fósforo, producir índoles totales, NH₃, exopolisacáridos, y tienen actividad ACC desaminasa (tabla 1). Esto coincide con reportes previos de cepas de diferentes especies pertenecientes al género *Bacillus* como de *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. insolitus*, *B. simplex*, *B. amyloliquefaciens*, *B. Thuringensis*, *B. altitudinis*, *B. megaterium* y *B. subtilis*, con capacidad de producir índoles totales (Lambrecht *et al.*, 2000; Lara *et al.*, 2011), solubilizar fosfatos (Ahmad *et al.*, 2008; Upadhyay *et al.*, 2011; Nautiyal *et al.* 2013; Kavamura *et al.*, 2013; Goswami *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2014; Goswami *et al.*, 2015), ACC deaminasa (Shen *et al.*, 2012; Angulo *et al.*, 2014), EPS, y producir NH₃ (Upadhyay *et al.*, 2011; Yadav *et al.*, 2014). *Bacillus amyloliquefaciens* KISA 34 no presentó actividad celulítica (tabla 1).

Los valores presentados en la tabla corresponden a la media de tres repeticiones.

Caracterización de las cepas seleccionadas bajo condiciones de estrés. En este estudio, bajo condiciones de estrés salino a concentraciones de 120 mM y 240 mM de NaCl, *B. amyloliquefaciens* KISA 34 y *B. subtilis* KISA 71 presentaron actividad de producción de índoles. Sin embargo, a una concentración de 580 mM de NaCl no se presentó esta actividad. En la determinación cuantitativa de fósforo soluble los resultados mostraron que el *B. amyloliquefaciens* KISA 34 y *B. subtilis* KISA 71 presentaron solubilización de fósforo en presencia de los tres niveles de estrés salino, disminuyendo esta actividad a medida que el porcentaje de sal aumentó (tabla 2).

El género *Bacillus* se encuentran entre las comunidades con mayor éxito en la actividad de solubilización de fosfatos (Wani *et al.*, 2007). En los estudios realizados por Cherif-Silini (2013), se informó que todas las cepas evaluadas del género tuvieron la capacidad de solubilizar el P a concentraciones de hasta un 1,0 % de NaCl en el medio.

B. licheniformis, *B. pumilus*, *B. coagulans* y *B. insolitus*, han sido reportados bajo condiciones no salinas; no obstante, contenidos de sal en el medio circulante disminuyen la producción de índoles totales y la solubilización de fósforo sin embargo, el potencial como PGPB bajo condiciones de estrés abiótico por salinidad se mantiene (Upadhyay *et al.*, 2011).

Evaluación de las bacterias Gram positivas seleccionadas y su efecto sobre el crecimiento de P. clandestinum bajo condiciones de estrés salino. Los resultados obtenidos indican que existen diferencias estadísticamente significativas en la altura de la planta y longitud radicular ($p \leq 0,05$) con la prueba de Kruskal-Wallis. El trata-

Tabla 1. Potencial de los aislados seleccionados para la promoción de crecimiento *Pennisetum clandestinum*.

Cepas	Amonio (µg/ml ¹)	Degradación de celulosa (IH)	ESP (ppm)	Índoles totales (µg/ml ¹)	Fósforo disponible (ppm)	Actividad ACCD (µmol α-KB/h/mg proteína)
KISA 34	13,8±0,2	0,0±0,0	16,6±2,4	48,67±1,6	123,9±4,7	11,3±1,3
KISA 71	4,7±0,1	2,37±0,0	8,9±1,0	8,17±0,90	72,91±3,5	20,3±2,6

Tabla 2. Caracterización de las cepas bajo condiciones de estrés salino.

Cepas	Índoles totales (µg ml ⁻¹)			Fósforo disponibles (ppm)		
	120 mM	240 mM	580 mM	120 mM	240 Mm	580 mM
KISA 34	17,3±0,4	5,6±0,5	0,0±0,0	105,6±4,7	64,8±4,2	9,8±0,7
KISA 71	5,9±0,2	4,3±0,1	0,0±0,0	34,7±4,2	23,1±1,7	13,7±0,4

miento T6 - KISA 34 + KISA 71+ 25% (RF) presenta un incremento de altura en un 8,2% respecto a la media en comparación con el T2- fertilización química completa. En cuanto a la longitud radicular T6 - KISA 34 + KISA 71+ 25% (RF) igualó al T2- fertilización química completa (figura 1).

Los resultados obtenidos coinciden con los reportados para *B. amyloliquefaciens* que ha reportado un aumento en la altura de las plantas de arroz de un 27,43 % y en la longitud radicular de un 73,17 %, cuando éste microorganismo ha sido inoculado bajo condiciones de salinidad (Nautiyal *et al.*, 2013). Goswami *et al.* (2014) también encontraron incrementos en el desarrollo de las plantas bajo condiciones de salinidad al emplear una cepa de *B. licheniformis* como inoculante, pero en un menor porcentaje, con un 24 % de incremento en la longitud total de la planta, y un 17 % en la longitud de la raíz, mientras que Kavamura *et al.* (2013) encontraron incrementos de un 17,02 % en la altura de maíz cuando empleó como inoculante una cepa de *Bacillus* sp. en condiciones de salinidad.

Tanto el peso seco aéreo como el peso seco de la raíz presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) según el ANOVA y prueba de Tukey (figura 2). El tratamiento T6: KISA 34 + KISA 71+25% (RF) mostró un incremento de la media del peso seco aéreo de 26,7 % y un incremento de 10,3 % en la media de peso seco de raíz con respecto al T2 de fertilización química completa.

Diferentes autores han informado incrementos en la producción de biomasa de plantas sometidas a estrés por salinidad cuando estas fueron inoculadas con cepas de *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* y *Bacillus* sp., con valores que oscilan entre un 5,8 % y un 226 % de aumento con respecto a los testigos no inoculados

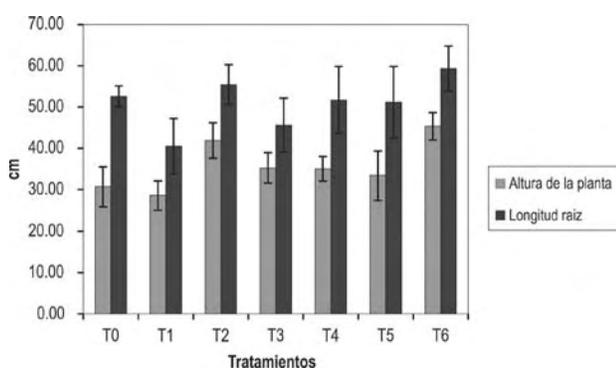


Figura 1. Altura y longitud radicular de las plantas *Pennisetum clandestinum* sometidas a los tratamientos T0: testigo absoluto sin sal ni fertilización, T1: testigo sin fertilización con sal, T2: fertilización química + 100% roca fosfórica (RF), T3: fertilización química +25%RF, T4: KISA 34 + 25%RF, T5: KISA 71 + 25%RF, T6: KISA 34 + KISA 71 +25% RF. Las barras de error representan la desviación estándar.

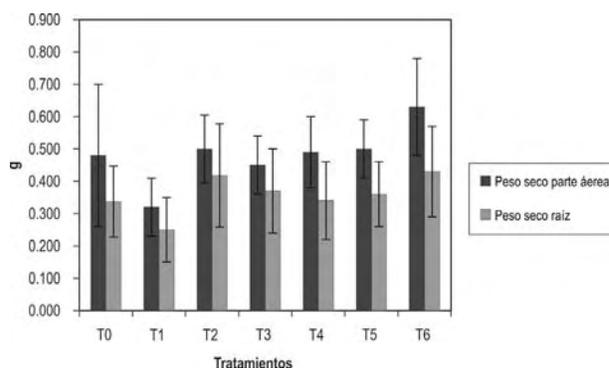


Figura 2. Peso seco de *Pennisetum clandestinum* sometidas a los tratamientos T0: testigo absoluto sin sal ni fertilización, T1: testigo sin fertilización con sal, T2: fertilización química + 100 % roca fosfórica (RF), T3: fertilización química +25 %RF, T4: KISA 34 + 25 %RF, T5: KISA 71 + 25 %RF, T6: KISA 34 + KISA 71 +25 % RF. Las barras de error representan la desviación estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos según prueba de Tukey para $p \leq 0,05$ ($n=14$).

(Upadhyay *et al.*, 2011; Nautiyal *et al.*, 2013; Kavamura *et al.*, 2013; Goswami *et al.*, 2014).

De esta forma, la aplicación de *Bacillus amyloliquefaciens* KISA 34 y *Bacillus subtilis* KISA 71 permitió una mayor producción de biomasa aérea y radicular por parte de las plantas de *P. clandestinum* al someter estas a un estrés por salinidad.

La promoción del crecimiento vegetal en condiciones de estrés abiótico por parte de microorganismos que tienen los mecanismos como PGPB descritos en el presente ensayo ha sido reportada ampliamente (Nadeem *et al.*, 2014; Shrivastava y Kumar, 2014) y particularmente para especies del género *Bacillus* como *B. licheniformis* (Upadhyay *et al.*, 2011; Goswami *et al.*, 2014), *Bacillus* sp. (Upadhyay *et al.*, 2011; Kavamura *et al.*, 2013; Patel & Saraf, 2013), *B. amyloliquefaciens* (Nautiyal *et al.*, 2013), *B. Pumilus*, *B. coagulans*, *B. insolitus* (Upadhyay *et al.*, 2011).

Es necesario destacar que entre los posibles efectos en la planta por los mecanismos PGPB de cepas de *Bacillus* bajo condiciones de estrés salino están, el incremento en el área foliar (Kavamura *et al.*, 2013), incremento en los contenidos de clorofilas (Heidari & Golpayegani, 2012; Patel & Saraf, 2013; Nautiyal *et al.*, 2013), incremento del contenido de prolina implicada en el balance de iones salinos (Patel & Saraf, 2013; Iqbal *et al.*, 2014). Lo anteriormente expuesto demuestra que el empleo de este tipo de microorganismos mejora la respuesta vegetal frente a condiciones de estrés (Heidari & Golpayegani, 2012; Patel & Saraf, 2013).

Tabla 3. Concentración de nutrientes presentes en tejido foliar y fósforo soluble de *Pennisetum clandestinum* bajo condiciones de salinidad.

T	P (%)	K ⁺ (%)	Ca ⁺⁺ (%)	Na ⁺ (%)	N (%)	PO ₄ = (mg kg ⁻¹)
T0	0,09±0,02 ^a	3,23±0,16 ^a	3,34±0,06 ^a	0,44±0,12 ^a	1,93±0,32 ^b	0,20±0,01 ^{ab}
T1	0,011±0,03 ^a	3,74±0,28 ^a	3,35±0,06 ^a	0,37±0,07 ^a	2,72±0,41 ^a	0,21±0,01 ^a
T2	0,011±0,05 ^a	3,50±0,47 ^a	3,35±0,09 ^a	0,44±0,18 ^a	2,68±0,25 ^a	0,19±0,02 ^{ab}
T3	0,010±0,04 ^a	3,29±0,30 ^a	3,32±0,05 ^a	0,41±0,14 ^a	2,65±0,27 ^a	0,19±0,02 ^{ab}
T4	0,011±0,04 ^a	3,19±0,35 ^a	3,28±0,03 ^a	0,39±0,15 ^a	2,78±0,14 ^a	0,18±0,01 ^{bc}
T5	0,010±0,02 ^a	3,16±0,40 ^a	3,28±0,01 ^a	0,36±0,13 ^a	2,73±0,37 ^a	0,17±0,01 ^c

Medias con letras no comunes dentro de cada variable difieren estadísticamente según prueba de Tukey para $p \leq 0,05$ (n=6). T: tratamientos. T0: testigo absoluto sin fertilización, T1: testigo Fertilización completa, T2: Fertilización completa + 25 % (roca fosfórica - RF), T3: KISA 34 + 25 % (RF), T4: KISA 71 + 25 % (RF), T5: KISA 34 + KISA 71+ 25 % (RF).

En el análisis foliar no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \geq 0,05$) en el porcentaje de P, K, Ca, Na y N (tabla 3).

Los resultados indican que hubo diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de fósforo soluble en suelo ($p \leq 0,05$) según el ANOVA y la prueba de Tukey (tabla 3). El tratamiento T5: KISA 34 + KISA 71+ 25 % (RF) presentó una disminución significativa de fósforo soluble en el suelo respecto al testigo químico completo donde se presentó un mayor contenido de PO₄ en el suelo. Estos resultados sugieren que la presencia de los inoculantes favorece la disponibilidad del P, debido a la capacidad de solubilización de fosfatos bajo condiciones de estrés salino (tabla 2), permitiendo que la planta absorba este elemento en lugar de quedar en el suelo como sucede en los tratamientos que no presentan inoculación.

Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que los efectos negativos que la salinidad produce en el desarrollo vegetal (Lazof & Bernstein, 1998; Munns, 2002; Parida & Das, 2005; Bui, 2013; Shrivastava & Kumar, 2014; Pompeiano et al., 2014), pueden mitigarse con el uso de microorganismos como inoculantes, siendo esta una tecnología alternativa para mejorar la capacidad de tolerancia al estrés salino en las plantas (Muscolo et al., 2003).

Conclusiones

Las cepas *Bacillus amyloliquefaciens* KISA 34 y *Bacillus subtilis* KISA 71, aisladas de la rizósfera del pasto *Pennisetum clandestinum*, tienen la capacidad de soportar altas concentraciones de sal en condiciones *in vitro* como *in vivo*.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente ensayo se pudo determinar que la inoculación con *Bacillus amyloliquefaciens* KISA 34 y *Bacillus subtilis* KISA 71 promueve el crecimiento de *P. clandestinum* bajo condiciones de estrés por salinidad.

Estas bacterias tienen múltiples actividades como PGPB facilitando la promoción del crecimiento y desarrollo de *P. clandestinum* en presencia de inhibidores del desarrollo como la sal, por lo que representan una área importante para investigaciones futuras.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Colombiano bajo el convenio número 1810 de 2013 y 1828 de 2014 con CORPOICA y al laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de biotecnología y Bioindustria (CBB).

Referencias bibliográficas

- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for the ir multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2), 173-181.
- Ali, S., Charles, T., Glick, B. (2014). Amelioration of high salinity stress damage by plant growth promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 160-167.
- Angulo, V., Sanfuentes, EA., Rodríguez, F., Sossa, K. (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista Argentina de Microbiología*, 46 (4), 338 -347.
- Bui, EN. (2013). Soil salinity: A neglected factor in plant ecology and biogeography. *Journal of Arid Environments*, 92, 14-25.
- Carulla, J., Cárdenas, E., Sánchez, N., Riveros, C. (2004). Valor nutricional de los forrajes más usados en los sistemas de producción lechera especializada de la zona andina colombiana; En: Eventos y Asesorías Agropecuarias EU (ed.), Seminario Nacional de Lechería Especializada: "Bases Nutricionales y su Impacto en la Productividad". Medellín, septiembre 1 y 2: p.21-38.
- Chaney, A and Marbach E. (1962). Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry*, 8 (2), 130-132.
- Cherif-Silini, H., Silini, A., Ghoul, M.; Yahiaoui, B., Arif, F. (2013). Solubilization of phosphate by the *Bacillus* under salt stress and in the presence of osmoprotectant compounds. *African Journal of Microbiology Research*, 7(37), 4562-4571.
- Dubois, M., Gilles, KA., Hamilton, JK., Rebers, PA., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28 (3), 352-356.

- Fiske, C. and Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, 66, 375-400
- García, A. (1986). Análisis químico de suelos, Tejido vegetal y aguas para riego. Determinación de Salinidad del Suelo Corpoica-Tibaitatá. p. 114-120.
- Glick, BR. (2004). Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Advances in applied microbiology*, 56, 291-312.
- Glickman, E., Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 61(2), 793-796.
- Goswami, D., Dhandhukia, P., Patel, P., Thakker, J. (2014). Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. *Microbiological Research*, 169(1), 66-75.
- Goswami, D., Thakker, J.N., Dhandhukia, P.C. (2015). Simultaneous detection and quantification of indole - 3 - acetic acid (IAA) and indole-3-butiric acid (IBA) produced by rhizobacteria from L-tryptophan (Tro) using HPTLC. *Journal of Microbiological Methods*, 110, 7-14.
- Gül, A., Kidoglu, F., Tüzel, Y. (2008). Effects of nutrition and *Bacillus amyloliquefaciens* on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) growing in perlite. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6(3), 422-429.
- Heidari, M., Golpayegani, A. (2012). Effects of water stress and inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant status and photosynthetic pigments in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 11(1), 57-61.
- Iqbal, N., Umar, S., Khan, N. A., Iqbal, M. (2014). A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: Regulation of proline metabolism. *Environmental and Experimental Botany*, 100, 34-42.
- Kavamura, V., Nobre, S., Da Silva, J., Parma, M., Aparecida, L., Visconti, A., Domingues, T., Gouvêa, R., Andreote, F., Soares, I. (2013). Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological Research*, 168(4), 183-191.
- Kumar, A., Maurya, B., Raghuwanshi, R. (2014). Isolation and characterization of PGPR and their effect on growth, yield and nutrient content in wheat (*Triticum aestivum*L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3 (4), 121-128.
- Lambrecht, M., Okon, Y., Broek, A., Vanderleyden, J. (2000). Indole-3-acetic acid: a reciprocal molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiology*, 8(7), 298-300.
- Lara, C., Oviedo L., Betancur, C. (2011). Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootecnia Tropical*, 29(2), 187-194.
- Lazof, D., Bernstein, N. (1998). The NaCl induced inhibition of shoot growth: the case for disturbed nutrition with special consideration of calcium nutrition. *Advances in Botanical Research*, 29, 113-189.
- Lizarazo-Medina, P. X., & Gómez-Vásquez, D. (2015). Microbiota rizosférica de *Espeletia* spp. de los páramos de Santa Inés y de Frontino-Urao en Antioquia, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 20(1), 175-182.
- Marais, J. (2001). Factors affecting the nutritive value of kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) – a review. *Tropical Grasslands*, 35, 65-84.
- Marais, P., Figenschou, D., Figueredo, DE M. (1992). Effect of nutrient calcium on the cell wall composition and digestibility of kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum* Hochst). *Journal of the Grassland Society of Southern Africa*, 9(2), 72-75.
- Martínez-Vivero, O., Jorquera, M., Crowley, D., Gajardo, G., Mora, M. (2010) Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(3), 293-319.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment*, 25(2), 239-250.
- Muscocolo, A., Panuccio, M., Eshel, A. (2013). Ecophysiology of *Pennisetum clandestinum*: a valuable salt tolerant grass. *Environmental and Experimental Botany*, 92, 55-63.
- Muscocolo, A., Panuccio, M., Sidari, M. (2003). Effects of salinity on growth, carbohydrate metabolism and nutritive properties of kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum* Hochst). *Plant. Science.*, 164, 1103-1110.
- Nautiyal, C., Srivastava, S., Singh, P., Seem, K., Mishra, A., Kumar, S. (2013). Plant growth promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 66, 1-9.
- Parida, S., Das, A. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60(3), 324-349.
- Patel, D., Saraf, M. (2013). Influence of soil ameliorants and microflora on induction of antioxidant enzymes and growth promotion of *Jatropha curcas* L. *European. Journal of Soil Biology*, 55, 47-54.
- Penrose, D., Glick, B. (2003). Methods for isolating and characterizing ACCdeaminase-containing plant growth promoting rhizobacteria. *Physiologia plantarum*, 118(1), 10-15.
- Pompeiano, A., Giannini, V., Gaetani, M., Vita, F., Guglielminetti, L., Bonari, E., Volterrani, M. (2014). Response of warm – season grasses to N fertilization and salinity. *Scientia Horticulturae*, 177, 92-98.
- Rincón, M., González, M., Hinestroza, A. (1998). Utilización de un sistema de información geográfica para la evaluación de tierras en el área rural del municipio de Paipa con fines de ordenamiento territorial. Universidad Distrital Francisco José de Caldas – Instituto Geográfico Agustín Codazzi.P. Bogotá (Colombia). p.78.
- Saharan, B., Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research*, 21, 1-30.
- Sánchez, D., Gómez, R., Garrido, M., Bonilla, R. (2012). Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(7), 1401-1415.
- Shen M., Kang Y., Wang H., Zhang X., Zhao, Q. (2012). Effect of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs) on plant growth, yield, and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) under simulated seawater irrigation. *The Journal of general and applied microbiology*, 58(4), 253-262.
- Shrivastava, P., Kumar, R. (2014). Soil salinity: A serious environmental issues and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(2), 123-131.
- Teather, R. and Wood, P. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(4), 777-780.
- Umashankar, N, Venkatesha, M., Krishnamurthy, R., Raveendra, R., Satish. K. (2012). Effect of microbial inoculants on the growth of silver Oak (*Grevillea robusta*) in nursery condition. *International Journal of Environmental Science and Development*, 3(1), 72-76.
- Upadhyay, S., Singh, J., Singh, D. (2011). Exopolysaccharide Producing Plant Growth Promoting Rhizobacteria Under salinity Condition. *Pedosphere*, 21 (2), 214- 222.
- Wani, P., Khan, M. S., Zaidi, A. (2007). Effect of metal tolerant plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp.(vigna) on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake by greengram plants. *Chemosphere*, 70(1), 36-45.
- Yadav, A., Ghosh, S., Verma, P., Kumar, A. (2014). Prospecting cold deserts of north western Kimalayas for microbial diversity and plant growth promoting attributes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(6), 683-693.

Efecto de carbón tipo lignito sobre el crecimiento y producción de pigmentos de *Arthrospira platensis*

Effect of coal type lignite on growth and production of pigments of *Arthrospira platensis*

Massiel Vanesa Rivera Gonzalez*, Liliana Gómez Gómez**,
Juan Guillermo Cubillos Hinojosa***, Arnaldo Peralta Castilla****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.49994

Resumen

La producción de biomasa y pigmentos a partir de *Arthrospira platensis* ha cobrado gran importancia, debido a que estos tienen aplicaciones en producción de alimentos, metabolitos de interés biotecnológico e industrial. No obstante, para la producción de biomasa y pigmentos se han utilizado diversos sustratos que generan altos costos. Se estudió el crecimiento y producción de pigmentos de *A. platensis* bajo la influencia de seis concentraciones de carbón de bajo rango (CBR) tipo lignito (10, 20, 30, 40, 50, 60 mg/L) frente a una concentración de AIA (80 mg/L), se realizaron cultivos en batch en medio Zarrouk suplementados con CBR tipo lignito y AIA, bajo condiciones de aireación constante y fotoperiodos de 12:12 horas, durante 33 días. Los valores promedios más altos que se obtuvieron en cuanto a producción de biomasa y pigmentos se lograron en los cultivos suplementados con 50 y 60 mg/L de CBR tipo lignito con respecto a los controles. Los resultados obtenidos dan constancia al uso potencial del CBR como materia orgánica humificada, rica en nutrientes para el cultivo *A. platensis* que podrían ser aprovechado en medios acuíferos que son expuestos a la explotación carbonífera, contribuyendo a procesos de depuración y biorremediación de aguas contaminadas con materiales carboníferos.

Palabras clave: carbón tipo lignito, pigmentos, solubilización, tasa de crecimiento.

Abstract

The Biomass production and pigments from *Arthrospira platensis* has become very important, because these have applications in food production, metabolites of biotechnological and industrial products. However, for the production of biomass and pigments they have been used various substrates that generate high costs. Growth and pigment production *A. platensis* under the influence of six concentrations of low rank coal (LRC) type lignite (10, 20, 30, 40, 50, 60 mg / L) was tested against a concentration of AIA (80 mg / L), in batch cultures, performed in Zarrouk medium supplemented with LRC type lignite and AIA, under constant aeration and photoperiod of 12:12 hours, for 33 days. The highest average values obtained in terms of biomass production and pigments were achieved in the cultures supplemented with 50 and 60 mg/L of LRC type lignite with respect to the controls. The results provide evidence of the potential use of CBR as humified organic matter, rich in nutrients for growing *A. platensis* that could be tapped into aquifers means they are exposed to coal mining, contributing to processes of purification and bioremediation of contaminated waters carboniferous materials.

Key words: lignite coal type, pigments, solubilization, growth rate.

Recibido: octubre 5 de 2015

Aprobado: 20 de abril de 2016

* Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental, Universidad Popular del Cesar, Colombia, massielvrg@hotmail.com

** Bacterióloga, Profesor Facultad de Ciencias Básicas y de Educación, Universidad Popular del Cesar, Colombia, lilianagomez@unicesar.edu.co

*** Microbiólogo, MSc. Ciencias Agrarias, Profesor Departamento de Microbiología, Universidad Popular del Cesar, Colombia, juancubillos@unicesar.edu.co

**** Estadístico, MSc. Educación, Profesor Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Popular del Cesar, Colombia, arnaldoperalta@unicesar.edu.co

Introducción

La cianobacteria *Arthrospira platensis* se caracteriza por ser de rápido crecimiento, capaz de crecer en medios altamente alcalinos con presencia de carbonatos y fuentes de nitrógeno inorgánicas (Sánchez *et al.*, 2003; Ogbonda *et al.*, 2007). Este microorganismo, ha cobrado gran importancia a nivel internacional por la alta demanda de su biomasa y metabolitos (pigmentos y productos extracelulares) de valor biotecnológico, industrial y económico que tienen aplicaciones en la producción de alimentos, piensos, medicamentos terapéuticos, formulas farmacéuticas, etc. (Ramírez y Olvera, 2006; Volkmann *et al.*, 2007). Su consumo incrementa los niveles de energía, mejora el apetito y ofrece protección antioxidante (Sánchez *et al.*, 2003).

En la última década variados sustratos y diferentes estrategias de cultivo han sido evaluados con el fin de mejorar procesos biotecnológicos del cultivo de *A. platensis*, por lo que se ha evaluado su crecimiento en diferentes sustratos tales como aguas residuales porcinas (Chaiklahan *et al.*, 2010), orina humana diluida (Feng y Wu, 2006), melaza (Andrade y Costa, 2007), gallinaza (Ungsethaphand, 2009), AIA comercial el cual demostró ser un eficaz estimulante de crecimiento (Munawer y Mazharuddin, 2011; Gómez, *et al.*, 2012) y reguladores comerciales de crecimiento vegetal hecho a base de carbón (Prakash *et al.*, 2011). Pero muchas veces no se logra la productividad deseada debido a que algunos de estos insumos y sustratos para su cultivo presentan elevados costos, requieren pre-tratamientos para su utilización, contienen elementos químicos tóxicos que pueden biomagnificarse en la biomasa algal resultante y requieren condiciones especiales para su utilización (Munawer y Mazharuddin, 2011), por lo que su uso es poco viable desde un punto de vista de seguridad, económico y técnico.

El Carbón de Bajo Rango (CBR) tipo lignito es considerado un residuo de los procesos de extracción carbonífera, se caracteriza por ser normalmente blando y desmenuzable, con una aspecto mate y terroso. Adicionalmente posee altos niveles de humedad (30-45 %) y cenizas, y bajo contenido en carbono fijo, por lo que su contenido energético también es bajo. Debido al bajo grado de carbonificación estos materiales normalmente presentan alto contenido de sustancias húmicas (SH) (Peña *et al.*, 2005; Giannoulli *et al.*, 2009). Por su naturaleza orgánica y su contenido de elementos para la nutrición microbiana (Hölker *et al.*, 2002; Tao *et al.*, 2009) que mediante variados mecanismos pueden ser transformados generando productos útiles como las SH contenidas en su macroestructura (Peña, 2005).

Estudios han demostrado el efecto estimulante del CBR y sus derivados como los ácidos húmicos (AH) sobre el crecimiento de microalgas como *Dunaliella salina* (Gallego *et al.*, 2005). También se ha confirmado que pequeñas cantidades de AH pueden ser utilizados

como promotores de crecimiento de microalgas como *Scenedesmus acutus* y *Chlorella vulgaris* y de las algas verde-azul *Nostoc commune*, *Anabaena variabilis* y *Microcystis aeruginosa* (Vraná y Votruba, 1995; Pouneva, 2005; Kosakowska *et al.*, 2007) al promover la biodisponibilidad de nutrientes (debido al incremento de la solubilidad), participar en el incremento en la acumulación de biomasa, captación de nutrientes, biosíntesis de metabolitos, entre otros (Cacco *et al.*, 2000).

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de seis concentraciones de CBR tipo lignito sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de una cepa de *A. platensis* y evaluar su posible uso como sustrato para el cultivo de esta cianobacteria, a fin de aumentar su producción de biomasa y/o metabolitos y poder aportar al desarrollo de investigaciones en la obtención de mayores rendimientos de su cultivo a gran escala, como también a su posible uso en procesos de depuración y biorremediación de cuerpos de aguas contaminadas aledañas a la explotación carbonífera.

Materiales y métodos

Bioensayo de promoción de crecimiento de *Arthrospira platensis* con CBR tipo lignito. Sé utilizo una cepa de *A. platensis*, aislada del pozo de agua Salina Rica, (Maracaibo), la cual fue donada por el Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos de la Universidad de Zulia, Venezuela, cultivada y conservada en el Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental de la Universidad Popular del Cesar, Colombia. Cultivos viables de la cianobacteria se sometieron inicialmente a cuatro lavados con agua destilada estéril y se mantuvo en medio de crecimiento mineral Zarrouk 25 % (Zarrouk, 1966). Se utilizó un CBR tipo lignito colectado de la mina "El Cerrejón" (La Guajira, Colombia). Las características de carbón utilizado son mostradas en la tabla 1, correspondiente a un carbón de bajo rango tipo del lignito debido al alto contenido de humedad y bajo poder calorífico (menos de 6390 kcal/kg) (Cubillos *et al.*, 2015).

Para determinar el efecto de CBR tipo lignito sobre el crecimiento de *A. platensis*, cultivos en batch de 500 mL, en medio nutritivo Zarrouk al 25 %, fueron suplementados con partículas de carbón, de ± 1 mm promedio de diámetro, a diferentes concentraciones, de esta forma se establecieron los tratamientos de 10, 20, 30, 40, 50 y 60 mg/L de carbón; la elección del tamaño se basó en estudios realizados anteriormente por Gallego *et al.* (2005). Una concentración de 80 mg/L de ácido indol acético (AIA) fue tomada como control positivo de sustancias promotoras del crecimiento, para comparar el efecto de ambos suplementos sobre el crecimiento de la cianobacteria (Arancon *et al.*, 2006). Cultivos en medio Zarrouk 25% sin adición de CBR tipo lignito fueron tomados como control negativo.

Los ensayos fueron provistos de una irradiación de 50-60 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (aprox. 4000 lux) generada por

Tabla 1. Características fisicoquímicas de CBR tipo lignito usado en los bioensayos (Cubillos *et al.*, 2015).

Humedad	Ceniza	Sustancias volátiles	Poder calorífico	% de carbono fijo	S	C	H	O	N	pH
28.44%	11.12%	47.79	4781 kcal kg ⁻¹	41.09%	0.13%	46.04%	3.26%	42.95%	1.38%	5.6
Minerales en cenizas										
Fe ₂ O ₃	CaO	MnO ₂	MgO	SrO	K ₂ O	BaO				
4.24%	69.3%	0.14%	9.37%	0.89%	0.05%	0.08%				

tres lámparas fluorescentes, Philips Daylight con tubos de 40 W, de orientación lateral, ajustadas a un temporizador modelo 4001-00 Td-1724-00, para generar fotoperiodos (luz-oscuridad) de 12 h con luz 12 h sin luz y generando una temperatura promedio de 25-28 °C. Todos los cultivos fueron conectados a un sistema de aireación provisto de tubos, que eran alimentados por motores para acuarios de dos salidas, esto se hizo con el fin de mantenerlos homogeneizados y favorecer la distribución completa de los nutrientes y las células, además de permitir un buen intercambio de oxígeno y dióxido de carbono (CO₂) con el medio. Cada tratamiento se hizo con un inóculo inicial de 1x10⁻⁶ células/mL⁻¹, establecido en espectrofotómetro a una densidad óptica de 750 nm (DO₇₅₀) (Wiley, 1977; Bermúdez *et al.*, 2004) y pH inicial de 8-9 el cual se monitoreo utilizando un potenciómetro (pH-metro portátil 3110 WTW). Para el desarrollo de los ensayos se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA), se tuvieron en cuenta ocho (8) tratamientos con tres (3) repeticiones respectivamente y los cultivos se mantuvieron por 33 días en incubación.

Evaluación del crecimiento de *A. platensis*, con y sin previa exposición a CBR tipo lignito. El desarrollo del crecimiento en términos de peso seco de la biomasa (medido en mg.mL⁻¹) se determinó utilizando un sistema de filtración de Millipore (Sampling Manifold 1225) mediante el método modificado de Utting (Rodolfi *et al.*, 2009). Concentraciones de biomasa y producción de pigmentos fueron medidas cada 72 horas con un espectrofotómetro (Thermospectronic GENESYS 20). El contenido en µg mL⁻¹ de clorofila a y carotenoides se determinó utilizando como solvente metanol 95% a 665nm para clorofila a y 480 nm para carotenoides (Ritchie, 2008). La concentración de ficobiliproteínas fue estimada siguiendo el método de choque osmótico modificado por Soltani *et al.*, (2006) después de Wyman y Fay (1986) y medido a 615 nm para ficocianinas, 652 nm para aloficocianina y 562 nm para ficoeritrinas.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos fueron organizados en Excel y posteriormente sometidos a análisis de varianza (ANOVA) utilizando el paquete estadístico SPSS® versión 15, con un nivel de confianza de 95%

(p <0,05) con el fin de verificar diferencias significativas entre los tratamientos.

Resultados y discusión

Evaluar el crecimiento de *A. platensis* con CBR tipo lignito fue una estrategia para promover su crecimiento y producción de pigmentos, mediante la determinación del tiempo (día) en el que se presentó la máxima densidad celular (MDC) y la máxima producción metabólica (MPM). Los valores promedios para las tasas de crecimiento en contenido de biomasa (peso seco), pigmentos y pH indican que en términos lineales y de interacción, los tratamientos no presentan diferencias significativas entre sí para la mayoría de los parámetros analizados, solo entre tratamiento por tratamiento, demostrándose que los tratamientos de 50 y 60 mg/L de carbón difieren de los demás en cuanto a los resultados obtenidos, incluyendo el medio control y el medio que contenía AIA (tabla 2).

pH. Durante el proceso de incubación, el pH fue incrementando poco a poco hasta llegar a un promedio de 10 donde se mantuvo (figura 1a). El incremento en el pH puede estar correlacionado al consumo de la fuente de carbón a partir del bicarbonato que contiene el medio de cultivo Zarrouk, los iones de bicarbonato son asimilados por la cianobacteria y subsecuentemente convertidos en dióxido de carbono y carbonato (Raouf *et al.*, 2006). El pH alcalino pudo favorecer la solubilización de las partículas de CBR tipo lignito presentes en el medio, y también el contenido de SH en el mismo, aumentando así la disponibilidad de iones minerales para la nutrición de *A. platensis* (Volkman *et al.*, 2007).

Biomasa. El análisis de varianza demostró que no existen diferencias significativas entre los tratamientos para resultados de biomasa (peso seco) (p=0,166 >0.05); sin embargo, después de 18 días de incubación fueron observadas las concentraciones máximas de producción; la más alta para el tratamiento de 60 mg/L (MDC =4,3x10⁻³ mg.mL⁻¹). La tasa promedio más alta de crecimiento celular (PDC 2,6 x10⁻³ mg.mL⁻¹) se observó en el tratamiento de 50 mg/L (tabla 2, figura 1b). Estos resultados revelan que la cantidad de CBR tipo lignito utilizada por células de *A. platensis* actuaron como

Tabla 2. Tasa de valores promedios y producción máxima celular (peso seco) y metabólica de pigmentos en función en función del tratamiento y valores de pH.

Respuesta	Productividad	Tratamiento							
		10 mg/L CBR-Lignito	20 mg/L CBR-Lignito	30 mg/L CBR-Lignito	40 mg/L CBR-Lignito	50 mg/L CBR-Lignito	60 mg/L CBR-Lignito	Control (+) 80 mg/L AIA	Control (-) Zarrouk 25%
pH	Valor promedio	9.7	9.69	9.71	9.69	9.64	9.68	9.72	9.73
	Valor más alto	10	10	10	10	10	10	10	10
Peso seco	PDC (mg.mL ⁻¹)	1.8x10 ⁻³	1.9x10 ⁻³	2.5x10 ⁻³	2.6x10 ⁻³	2.6x10 ⁻³	2.4x10 ⁻³	2.6x10 ⁻³	2.4x10 ⁻³
	MDC (mg.mL ⁻¹)	2.7x10 ⁻³	2.7x10 ⁻³	3.9x10 ⁻³	3.9x10 ⁻³	3.7x10 ⁻³	4.3x10 ⁻³	3.9x10 ⁻³	3.2x10 ⁻³
Clorofila a	PCM (µg.mL ⁻¹)	1.5	2.1	3.6	3.6	4.5	5.0	3.9	3.1
	MCM (µg.mL ⁻¹)	4.9	5.0	13.2	10.8	13.2	17.0	9.5	8.5
Carotenoides	PCM (µg.mL ⁻¹)	0.62	0.71	1.00	1.1	1.4	1.6	1.5	1.3
	MCM (µg.mL ⁻¹)	1.9	1.6	2.0	2.2	5.4	4.2	3.8	3.1
Ficocianina	PCM (µg.mL ⁻¹)	2.3	3.0	5.5	6.3	7.2	5.6	4.9	4.1
	MCM (µg.mL ⁻¹)	4.7	4.7	9.8	20.0	26.3	11.8	11.3	8.8
Aloficocianina	PCM (µg.mL ⁻¹)	3.3	3.4	4.8	3.6	3.2	4.6	5.1	4.2
	MCM (µg.mL ⁻¹)	8.6	8.1	7.5	8.3	7.5	11.2	13.5	10.9
Ficoeritrina	PCM (µg.mL ⁻¹)	1.3	1.2	2.1	1.9	2.4	2.56	2.4	2.2
	MCM (µg.mL ⁻¹)	3.0	3.0	2.8	3.0	4.7	5.9	4.9	4.4

PDC: promedio densidad celular; MDC: máxima densidad celular; PCM: promedio concentración metabólica; MCM: máxima concentración metabólica

proliferante celular; estos hallazgos se asemejan mucho a los obtenidos por Gallego *et al.* (2005), quienes demostraron que concentraciones de 45 y 50 mg/L de carbón subbituminoso produjo un mejor estímulo sobre el crecimiento de la microalga *Dunaliella salina* alcanzando una alta tasa de densidad celular después de 14 días de incubación. Este aumento en la producción de biomasa, en los tratamientos de 50 y 60 mg/L de

CBR tipo lignito, pudo deberse al aprovechamiento de compuestos biodisponibles, ya sea liberados espontáneamente desde las partículas de carbón o tomados mediante procesos oxidativos o de solubilización; la capacidad de intercambio del carbón en el medio, fue mejorada al ser solubilizado, debido a las condiciones alcalinas que presentaban los medios, lo que dio lugar a la generación de AH los cuales son asimilables por

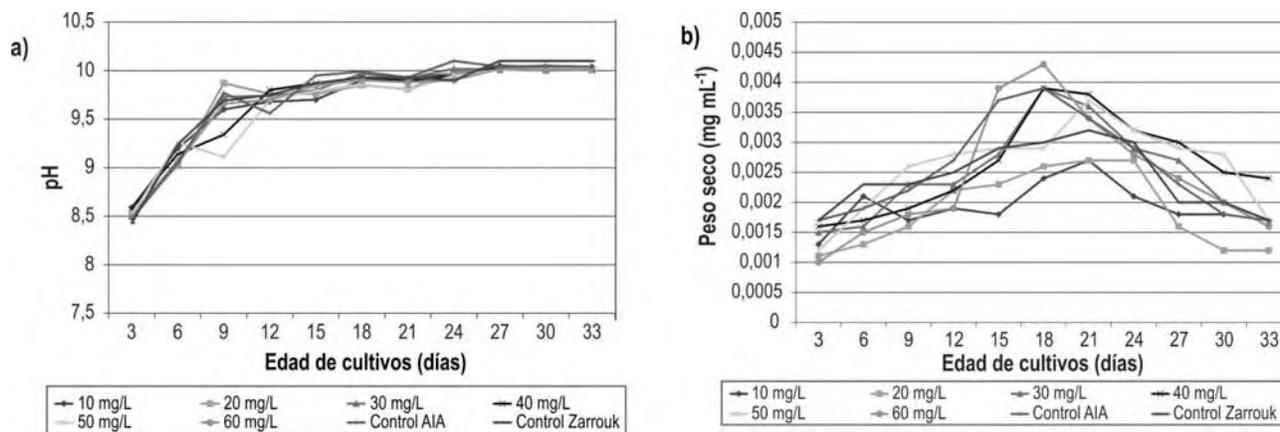


Figura 1. a) Efectos de CBR tipo lignito sobre pH de cultivos de *A. platensis*. b) producción de biomasa (peso seco mg mL⁻¹) de *A. platensis* a través del tiempo de cultivo en los diferentes tratamientos experimentales (10, 20, 30, 40, 50 y 60 mg/L de CBR tipo lignito y tratamientos controles)

las células para utilizarlas en su desarrollo (Thurman et al., 1982). Estos resultados son comparados positivamente con el tratamiento control positivo de AIA del cual se ha demostrado su capacidad de promoción de crecimiento celular (Steinbüchel, 2001; Gómez et al., 2012). Se ha reportado que tanto el AIA como los AH muestran similares mecanismos y vías de acción de estimulación de crecimiento y desarrollo vegetal y microbiano (Nardi et al., 2002; Pasqualoto et al., 2009).

Clorofila a y Carotenoides. La producción de clorofila a y carotenoides son factores importantes en el crecimiento de *A. platensis*. El análisis de varianza mostró que no existen diferencias significativas entre los tratamientos tanto para clorofila ($p=0.207>0.05$) como para carotenoides ($p=0.188>0.05$); sin embargo, para el contenido celular de pigmentos cloroplásticos en los bioensayos se observó un aumento en las concentraciones de clorofila para los tratamientos que contenían 50 y 60 mg/L de CBR tipo lignito (PCM= 5.0 y 4.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) respectivamente (tabla 2, figura 2a). El mejor resultado en producción promedio de carotenoides se logró con el tratamiento de 60 mg/L (PCM= 1.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (figura 2b).

Con base en los resultados de determinación de pigmentos se puede inferir que en los tratamientos donde se pudo apreciar un estímulo en la producción de clorofila a y carotenoides (tratamientos 50 y 60 mg/L), el CBR tipo lignito y los productos generados de su oxidación tales como AH, pudieron haber actuado como materiales quelantes y de intercambio iónico capaz de captar iones en la solución nutriente y favorecer la disponibilidad de los mismos para que *A. platensis* produzca una mayor concentración de pigmentos, así como, también incrementar la permeabilidad de la membrana celular; permitiendo una mayor absorción de nutrientes. Se ha reportado que los AH incrementan de muchas formas las tasas de crecimiento de microorganismos, ya sea mediante la estimulación de enzimas, liberación de elementos traza tales como el hierro a las superficies de células microbianas, actuando como

bombas de transporte de electrones para ayudar a los organismos mediante la reducción de compuestos orgánicos y metales, participando en la formación fotolítica de sustratos de bajo peso molecular permitiendo su mejor asimilación, actuando como un material de intercambio iónico incrementando los nutrientes inorgánicos limitantes, actuando como agente sensibilizante que permite una mayor permeabilidad celular incrementando la captación de nutrientes y estimulando las poblaciones microbianas asociadas a la cianobacteria (Jørgensen et al., 1998; Bertilsson y Tranvik, 2000; Kieber, 2000; Pouneva, 2005).

Estudios donde se utilizó carbón subbituminoso como promotor de crecimiento de *Dunaliella salina* se encontró la mejor producción de pigmentos a una concentración de 45mg/L de carbón subbituminoso en un medio de cultivo no convencional (Gallego et al., 2005). Hallazgos hechos por Prakash et al. (2011) demostraron que concentraciones de AH de 40 mg/L, provenientes de compost de arroz y suelo, incrementaron los contenidos en biomasa en peso seco, clorofila a, carbohidratos y ácidos grasos en cultivos de *A. platensis* después de 21 días de incubación. Se ha reportado que extractos de AH solubles en agua, derivados de fuentes del carbón lignito natural oxidado (leonardita), adicionadas a bajas concentraciones (1, 10 y 100 ppm) en *Chlorella vulgaris* en condiciones de oscuridad, coadyuvaron al crecimiento y síntesis de clorofila, lo cual fue atribuido a la habilidad del extracto de suministrar Fe^{+2} al alga (Ukeles y Rose, 1976).

Ficobiliproteínas. A pesar de que los tratamientos no presentaron diferencias mínimas significativas en el contenido de aloficocianina ($p=0.861>0.05$), ficoeritrina ($p=0.253>0.05$) y ficocianina ($p=0.259>0.05$) con respecto a los controles; en el tratamiento que contenía 50 mg/L se observó la mayor concentración (MCM= 26.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y la tasa promedio de producción más alta para ficocianina (PCM= 7.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (tabla 2, figura 3a). Por otra parte, las tasas de valor promedio más altas para aloficocianina (PCM= 2.56 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y

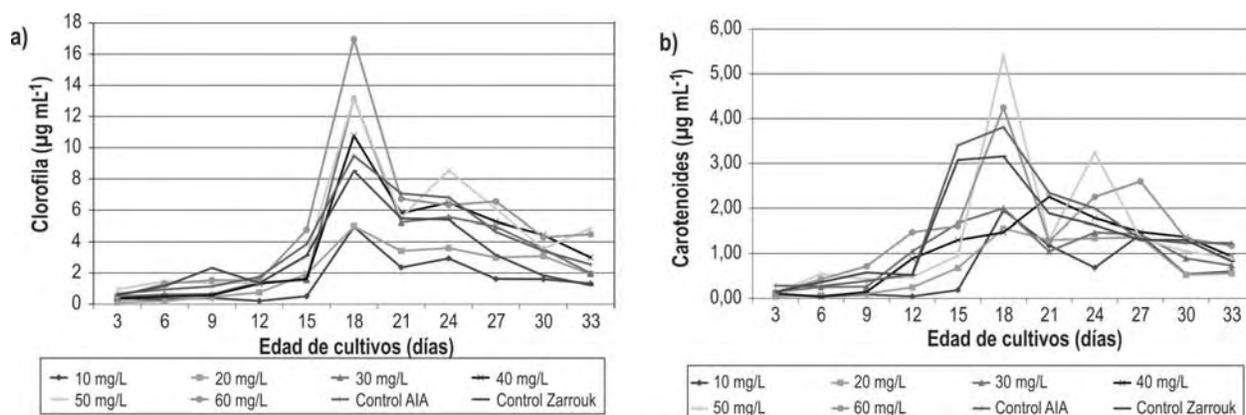


Figura 2. Producción de pigmentos por *A. platensis*, a través del tiempo de cultivo en los diferentes tratamientos experimentales (10, 20, 30, 40, 50 y 60 mg/L de CBR tipo lignito y tratamientos controles): a) clorofila a. b) carotenoides.

ficoeritrina ($PCM= 5.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) se observaron en los tratamientos 60mg/L de CBR tipo lignito y 80 mg/L de AIA, respectivamente. Las concentraciones máximas para aloficocianina ($MCM= 11.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) y ficoeritrina ($MCM= 4.7 \mu\text{g.mL}^{-1}$) se observaron el día 27 en el tratamiento que contenía 60mg/L de CBR tipo lignito (figuras 3b y 3c).

En todas las curvas de crecimiento de producción de fibobiliproteínas, además de la de carotenoides (figura 2a), se puede apreciar que después de un ritmo de crecimiento lento, la producción de estos pigmentos incrementa y alcanzan una concentración máxima, para luego declinar su producción y dar paso a un posterior incremento de la producción de estos pigmentos. Por ejemplo, en ficocianina la producción máxima de pigmentos se reflejó el día 21; luego para aloficocianina la producción más alta fue constante desde el día 12 y sigue el 15, continúa 18 y el 24 y finalmente ficoeritrina su producción tuvo más relevancia los días 12 y 24 (figura 3) esta producción acelerada y desacelerada de compuestos puede deberse a procesos de polimerización y despolimerización propios de las SH contenidas en carbones de bajo rango, muchos autores han descrito a estas sustancias como complejas moléculas de alto peso molecular sin una estructura química de-

finida, entre ellas los AH presentan el más alto peso molecular, además de que al poseer la característica de ser solubles en pH alcalinos tienen la capacidad de reagruparse en grandes moléculas aun después de ser solubilizadas en pequeñas partes (Thurman *et al.*, 1982); bajo este contexto se ha sugerido que las SH, aunque en sus estructuras dominan compuestos de alto peso molecular, pueden también contener componentes de bajo peso molecular con estructuras similares a las fracciones de alto peso molecular (De Nobili *et al.*, 1995). Ji *et al.* (1983) demostró que estas fracciones de bajo peso molecular se vuelven fácilmente asimilables por las algas promoviendo su estímulo temprano de crecimiento, dilucidando de esta forma que el fenómeno citado en este estudio, en referencia a los cambios en las curvas de crecimiento, puede ser explicado atendiendo a los conceptos anteriormente expuestos.

Conclusiones

A. platensis presentó un crecimiento óptimo en los tratamientos que se emplearon 50 y 60 mg/mL de CBR tipo lignito, lográndose una mayor producción de biomasa y pigmentos muy por encima de la producción

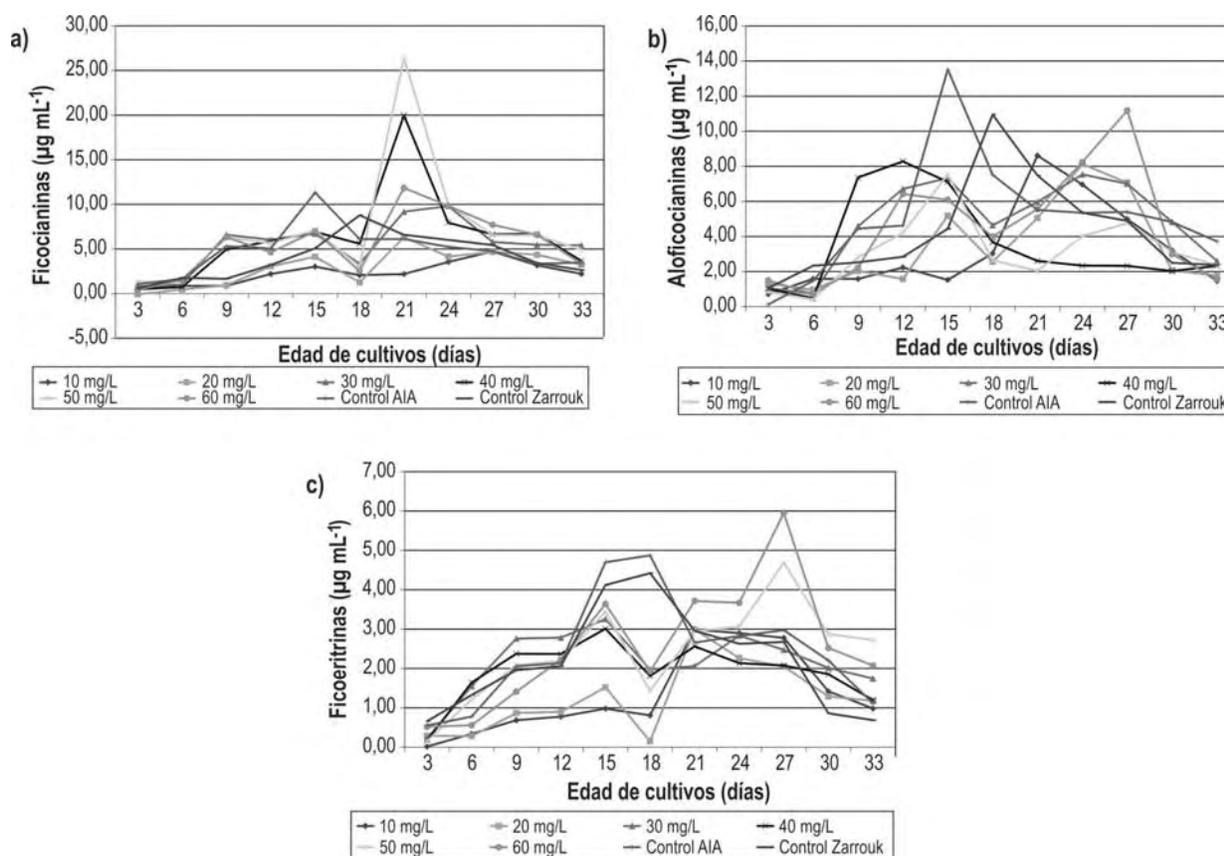


Figura 3. Producción de pigmentos de tipo fibobiliproteínas por *A. platensis*, a través del tiempo de cultivo en los diferentes tratamientos experimentales (10, 20, 30, 40, 50 y 60 mg/L de CBR tipo lignito y tratamientos controles): **a)** Ficocianinas. **b)** Aloficocianinas. **c)** Ficoeritrinas.

obtenida en los medios convencionales Zarrouk y el tratamiento que contenía 80mg/L de AIA, a pesar de que no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos. Adicionalmente, la adición de partículas de CBR tipo lignito no afecta el pH del medio.

El uso de CBR tipo lignito podría constituirse en una alternativa biotecnológica para el mejoramiento de la producción de biomasa de cianobacterias y algas, debido a que *A. platensis* presenta buen crecimiento en medios de cultivos que son suplementados con este tipo de sustratos, por lo que se puede ratificar la alta versatilidad de metabolismo de esta cianobacteria para crecer en medios diferentes a los tradicionales. *A. platensis* también se podría utilizar en medios acuíferos que son expuestos a explotación carbonífera contribuyendo a procesos de depuración y biorremediación de aguas contaminadas con materiales carboníferos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Popular del Cesar y Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental por su apoyo técnico y científico en la realización de esta investigación.

Referencias bibliográficas

- Andrade, M., Costa, J. (2007). Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*, 264 (1-4), 130-134.
- Arancon, N., Edwards, C., Lee, S., Byrne, R. (2006). Effects of humic acids from vermicomposts on plant growth. *European Journal of Soil Biology*, 45, 65-69.
- Bermúdez, J., Rosales, N., Loreto, C., Briceño, B., Morales, E. (2004). Exopolysaccharide, pigment and protein production by the marine microalga *Chroomonas* sp. in semicontinuous cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 179-183.
- Bertilsson, S., Tranvik, L. (2000). Photochemical transformation of dissolved organic matter in lakes. *Limnology Oceanography*, 45, 753-762.
- Cacco, G., Attina, E., Gelsomino, A., Sidari, M. (2000). Effect of nitrate and humic substances of different molecular size on kinetic parameters of nitrate uptake in wheat seedlings. *Journal of plant nutrition and soil science*, 163, 313-320.
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Siangdung, W., Paithoonrangarid, K., Bunnag, B. (2010). Cultivation of *Spirulina platensis* using pig wastewater in a semi-continuous process. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(3), 609-614.
- Cubillos, J., Valero, N., Melgarejo, L. (2015). Assessment of a low rank coal inoculated with coal solubilizing bacteria as an organic amendment for a saline-sodic soil. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2, 21
- De Nobili, M., Baca, M., Milani, N. (1995). Scanning electron microscopy of humic substances produced during cellulose decomposition. *Chemistry and Ecology*, 11, 55-66.
- Feng, D. Wu, C. (2006). Culture of *Spirulina platensis* in human urine for biomass production and O₂ evolution. *Journal of Zhejiang University science*, 7 (1), 34-37.
- Gallego, E., Suarez, S. Leal, E., Vargas, C. (2005). Estudio de un carbón subbituminoso como promotor de crecimiento de *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905). *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 17, 13-70.
- Giannoulli, A., Stavros, K., Siavalas, G., Chatziapostolou, A., Christanis, K., Papazisimou, S., Papanicolaou, C., Foscolos, A. (2009). Evaluation of greek low-rank coals as potential raw material for the production of soil amendments and organic fertilizers. *International Journal of Coal Geology*, 477 (3-4), 383-393.
- Gómez, L., Valero, N., De Brigard, R. (2012). Bacterias halotolerantes/ alcalofilas asociadas a la cianobacteria *Arthrospira platensis* promueven crecimiento temprano de *Sorgum bicolor*. *Agronomía Colombiana*, 30(1), 111-115.
- Hölker, U., Schmiere, H., Grobe, S., Winkerhofer, M., Polzakiewicz, M., Ludwig, S. Dohse, J. and Hofer, M. (2002). Solubilization of low-rank coal by *Trichoderma atroviridae*: Evidence for the involvement of hydrolytic and oxidative enzymes by using ¹⁴C-labelled lignite. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28, 207-212.
- Ji, M., Cao, W., Han L. (1983). Studies on marine humic substances. Isolation of humic substances from seawater with an effective adsorbent, GDX-102 adsorption resin. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 1(2), 200-209.
- Jørgensen, N., Tranvik, L., Edling, H., Granéli, W., Lindell, M. (1998). Effects of sunlight on occurrence and bacterial turnover of specific carbon and nitrogen compounds in lake water. *FEMS Microbiology Ecology*, 25 (3), 217-227.
- Kieber, D. (2000). Photochemical production of biological substrates. En: Mora S., Demers S., Vernet M. (Eds). The effects of UV radiation in the marine environment. Cambridge University Press, New York. 130-148.
- Kosakowska, A., Marcin, N., Janusz, P. (2007). Responses of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to iron and humic substances. *Plant Physiology Biochemistry Journal*, 45, 365-370.
- Munawar, M., Mazharuddin, M. (2011). Production of carotenoids (antioxidants/ colourant) in *Spirulina platensis* in response to indole acetic acid (IAA). *International Journal of Engineering Science and Technology*, 3 (6), 4973.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A. (2002). Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology Biochemistry*, 34, 1527-1536.
- Ogbonda, K., Aminigo, R., Abu, G. (2007). Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. *Bioresource Technology*, 98, 2207-2211.
- Pasqualoto, L., Canellas, F., Lopes, A., Okorokova, F., Rocha, A. (2009). Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology*, 130, 1951-1957.
- Peña, E., Havel, J., Patocka, J. (2005). Humic substances-Compounds of still unknown structure applications in

- agriculture, industry, environment and biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine*, 3, 13-24.
- Pouneva, I. (2005). Effect of humic substances on the growth of microalgal cultures. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52 (3), 410-413.
- Prakash, P., Dhanalakshmi, P., Anusha, B., (2011). Effect of humic acid on *Spirulina platensis* production and analysis of nutrient contents. *Recent Research in Science and Technology*, 3(1), 87-89.
- Ramírez, L., Olvera, R. (2006). Uso tradicional y actual de *Spirulina* (*Arthrospira* sp). *Interciencia*, 31(9), 657-663.
- Raof, B., Kaushika, B. Prasanna, R. (2006). Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. *Bio-mass and Bioenergy*, 30, 537-542.
- Rodolfi, L., Chini, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 100-112.
- Ritchie, R. (2008). Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica*, 46(1), 115-126.
- Sánchez, M., Bernal, J., Rozo, C., Rodríguez, L. (2003). *Spirulina* (*Arthrospira*): an edible microorganism: a review. *Universitas Scientiarum*, 8 (1), 7-24.
- Soltani, N., Khavari, R., Tabatabaei, Y. (2006). Variation of nitrogenase activity, photosynthesis and pigmentation of the cyanobacterium *Fischerella ambigua* strain FS18 under different irradiance and pH values. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 22, 571- 576.
- Steinbüchel, A. (2001). Biopolymers. Vol. 1: Lignin, Humic Substances and Coal. Weinheim: Institute of Microbiology, University of Münster. Wiley-VCH.
- Tao, X.X., Pan, L.Y., Shi, K.Y., Chen, H., Yin, S.D., Luo, Z. F. (2009). Bio-solubilization of Chinese lignite I: extra-cellular protein analysis. *Mining Science and Technology*, 19, 0358-0362.
- Thurman, E., Weshaw, R., Malcolm, R., Pickney, D., (1982). Molecular size of aquatic humic substances. *Organic Geochemistry*, 4, 27- 35.
- Ukeles, R., Rose, W. (1976). Cultivation of plants. Methods of culture. *Marine Biology*, 37, 11-28.
- Ungsethaphand, T., Peerapornpisal, Y., Whangchai, N. (2009). Production of *Spirulina platensis* using dry chicken manure supplemented with urea and sodium bicarbonate. *International Journal Science Technology*, 3(3), 379-387.
- Volkman, H., Imianovsky, U., Furlong, E., Barcelos, O., Sant, E. (2007). Influence of desalinator wastewater for the cultivation of *Arthrospira platensis*. Fatty acids profile. *Grasas y Aceites*, 58(4), 396-401.
- Vraná, D., Votruba, J. (1995). Influence of soluble humic substances on the growth of algae and blue-green algae. *Folia Microbiológica*, 40 (2), 207-208.
- Wiley, J. (1977). An improved method for optical density measurement of the semimicroscopic blue green alga *Spirulina maxima*. *Biotechnology and Bioengineering*, 19, 1219-1224.
- Wyman, M., Fay, P. (1986). Underwater light climate and the growth and pigmentation of planktonic bluegreen algae (Cyanobacteria). I. Influence of light quantity. *Proceedings of the Royal Society of London*, 227, 367-380.
- Zarrouk, C. (1966). Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*. Ph.D. Thesis, Université de Paris, Paris.

Assessment three constitutive promoters for GUS expression in rice (*Oryza sativa* L., var. J-104)

Evaluación de tres promotores constitutivos para la expresión GUS en arroz (*Oryza sativa* L., cv. J-104)

Maylin Pérez Bernal^{*}, Daymí Abreu Remedios^{**}, Onel Valdivia Pérez^{***},
Magalis Delgado Rigo^{****}, Raúl Armas Ramos^{*****}

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57716

Abstract

This work analyzed the constitutive expression of the β -Glucuronidase (GUS) reporter gene fused to three promoters: the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S, the chimerical A9 promoter which contains rice *Act1*, and the Ubiquitine-1 promoter from maize. The activity of the promoters was qualitative and quantitatively obtained in different tissues and various growth stages of rice plants (cv J-104) transformed by biolistic. All the promoters were found to be active, with distinct patterns of relative activity in leaves, stem and roots from *in vitro* and *ex vitro* plants, and in plants of T₁ progeny. The chimerical A9 promoter increased significantly levels of GUS expression in all the tissues and at all growth stages of the plants.

Key words: CaMV 35S, chimerical A9 promoter, ubiquitine-1.

Resumen

Se analizó la expresión constitutiva del gen reportero de la β -Glucuronidasa (GUS) fusionado a tres promotores: el 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el promotor quimérico A9 que contiene la actina-1 de arroz y el promotor ubiquitina-1 de maíz. La actividad de los promotores fue analizada cualitativa y cuantitativamente en diferentes tejidos y estadios de crecimiento de plantas de arroz (variedad J-104) transformadas mediante biobalística. Se demostró la expresión constitutiva de GUS bajo los promotores estudiados, con distintos patrones de actividad relativa en hojas, tallos y raíces de plantas *in vitro* y *ex vitro*, y en plantas de la progenie T₁. Bajo el promotor quimérico A9 se lograron los mayores niveles de expresión GUS en todos los tejidos y fases de crecimiento de las plantas.

Palabras clave: CaMV 35S, promotor quimérico A9, ubiquitina-1.

Recibido: diciembre 14 de 2015 **Aprobado:** mayo 11 de 2016

Introduction

A constitutive promoter is able to drive gene expression in many or all tissues of a plant (Xiao *et al.*, 2005). There are several advantages in using constitutive pro-

motors in expression vectors used in plant biotechnology, such as: elevated production of proteins to select transgenic cells or plants; high level of expression of reporter proteins, allowing easy detection and quantifi-

* MSc Plant Biology, Research Department. Center for Genetic Engineering and Biotechnology of Sancti Spiritus. P.O.Box 83, P.C. 60200. Sancti Spiritus, Cuba. e-mail: maylin.perez@cigb.edu.cu (corresponding author)

** MSc Plant Biology, Research Department. Center for Genetic Engineering and Biotechnology of Sancti Spiritus. P.O.Box 83, P.C. 60200. Sancti Spiritus, Cuba, e-mail: daymi.abreu@cigb.edu.cu

*** MSc Plant Biology, Research Department. Center for Genetic Engineering and Biotechnology of Sancti Spiritus. P.O.Box 83, P.C. 60200. Sancti Spiritus, Cuba, e-mail: onel.valdivia@cigb.edu.cu

**** Laboratory Technician, Research Department. Center for Genetic Engineering and Biotechnology of Sancti Spiritus. P.O.Box 83, P.C. 60200. Sancti Spiritus, Cuba, e-mail: magalis.delgado@cigb.edu.cu

***** MSc Plant Biology, Research Department. Center for Genetic Engineering and Biotechnology of Sancti Spiritus. P.O.Box 83, P.C. 60200. Sancti Spiritus, Cuba, e-mail: raul.armas@cigb.edu.cu

cation; high production of a transcription factor that is part of a regulatory transcription system; productions of compounds that requires ubiquitous activity in the plant, and compounds that are required during all stages of plant development (Park *et al.*, 2010).

The cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S gene promoter is the most commonly used in plant biotechnology research to drive transgene expression in a constitutive form. However, although the 35S promoter and its derivatives can drive high levels of transgene expression in dicotyledonous plants; their activities are lower in monocotyledonous plants (Park *et al.*, 2010). Moreover, CaMV35S promoter may increase the chances of transcriptional inactivation (Stam *et al.*, 1997), and its expression can be modulated by photoperiod, temperature and the developmental stage of the plants (Obertello *et al.*, 2005).

Others constitutive promoters have been assessed for their capability to drive the expression of transgenes in monocots, including ZmUbi1 (Cornejo *et al.*, 1993) from maize, and Act1 (McElroy *et al.*, 1990), OsCc1 (Jang *et al.*, 2002), RUBQ1 and 2 (Wang and Oard, 2003), rubi3 (Lu *et al.*, 2008), and OsAct2 (He *et al.*, 2009) from rice. These promoters are highly active in monocot crops, but they are also dissimilar in various ways.

The rice *Act1* promoter is one of the most frequently used highly active and constitutive promoter, for the establishment of transformation procedures and expression of foreign genes in rice and other monocots. Plant actin promoters are likely to be active in all tissues because actin is a fundamental component of the plant cell cytoskeleton. In rice, there are at least eight actin-like sequences per haploid genome; four of these have been isolated and shown to differ from each other in the tissue- and stage-specific abundance of their respective transcripts. The rice actin 1 gene, *Act1*, was found to encode a transcript that is relatively abundant in all rice tissues and at all developmental stages examined (McElroy *et al.*, 1990).

Another constitutive promoter that is also commonly utilized for transformation of monocots is the maize *Ubi* promoter. This promoter is active in many, although not all, cell types and drives strong expression in young roots and leaves, but these expression levels decrease markedly as these organs mature (Cornejo *et al.*, 1993). In general, the maize *Ubi* promoter has slightly higher activity than the rice *Act1* promoter in various monocot species.

Reporter genes have been used in all tissues and at all growth stages of transgenic plants and they are integral components for plant transformation studies. A widely used reporter gene is the *gus* gene that encodes the enzyme β -glucuronidase (GUS) (Jefferson *et al.*, 1987). The β -glucuronidase assay is very sensitive, and it is possible to obtain both qualitative (histochemical) and quantitative (fluorometric) data. Studies on *gus* repor-

ter gene fusion system have been conducted for various purposes like: (i) to understand developmental patterns of gene expression; (ii) to optimize the particle bombardment parameters; (iii) to compare different transformation methods; (iv) to identify the ideal promoter for plant species transformation and (v) to compare the best explant for plant transformation and regeneration (Basu *et al.*, 2004). GUS reporter gene is routinely used for promoter analyses (Obertello *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2010).

With the aim of obtain a highly efficient promoter that could drive constitutive transgene expression in the cuban rice cultivar J-104, three different promoters fused to the *gus* reporter gene were introduced in rice calli, via microprojectile bombardment. The promoters were the CaMV 35S, the chimerical A9 promoter and the Ubiquitine-1 promoter. The activity of the constitutive promoters was qualitative and quantitatively analyzed, using the GUS reporter system (Jefferson, 1987), in different tissues and at various growth stages of transgenic rice plants obtained from calli.

Materials and methods

Plant material

Mature rice (*Oryza sativa* L., cv J-104) seeds were manually dehulled and washed with water, following surface sterilization with a brief (30 s) rinse with 70% ethanol. The seeds were treated with 2.5% active chlorine solution for 25 min. The seeds were thoroughly washed six times with sterilized distilled water, and were shifted separately to sterilized filter papers for drying.

The callus induction medium consisted of salts and vitamins from N6 (Chu *et al.*, 1975), 30 g/L sucrose, 1.0 g/L casein hydrolysate, 2.0 mg/L 2,4-D and 2.0 g/L Phytigel. The culture medium was poured into Petri dishes, with 10 seeds per dish. Cultures were maintained in darkness at 28 °C. After 30 days the calli were excised from the seeds and were used as explants for microprojectile bombardment.

Plasmids

Three plant vectors were used: p35SGUS, pUbiGUS and pA9GUS, which contained CaMV35S (cauliflower mosaic virus 35S), Ubi1 from maize (Cornejo *et al.*, 1993) and A9 (chimerical promoter), respectively, having *gus* gene and the nopaline synthase terminator from *Agrobacterium tumefaciens*.

The chimerical A9 promoter consisted of the quadruplicated octopine synthase enhancer element from *Agrobacterium tumefaciens*, a version from active region of the CaMV35S promoter, and the first exon/intron/exon from rice *Act1* (McElroy *et al.*, 1990).

The plasmid DNA preparations were carried out according to the supplier instructions (QIAprep® miniprep kit, QIAGEN).

Microprojectile bombardment

Gold particles of 1.0 µm diameter were coated with the DNA plasmid as described by Taylor and Vasil (1991). Three sessions of bombardment, with 10 plates each one, were carried out. Fifteen calli of 2–3 mm in length were placed onto N6 (Chu *et al.*, 1975) medium with 0.8 M mannitol, in each 6-cm diameter dish and bombarded with 0.154 µg gold and 0.350 µg DNA, after a vacuum of 700 mm Hg was attained. Target distance was adjusted to 6 cm from stopping plate to callus tissue.

After bombardment, calli were kept 16 h in the dark, and then were transferred to callus induction medium and they were maintained two weeks in the dark at 28°C.

Plant regeneration

The plant regeneration from calli was done using the KIBAM culture medium (Pérez Bernal *et al.*, 2007). Cultures were maintained during a month at 25±2°C in environmentally controlled room under illumination of 1500 lux emitted by fluorescent tubes.

Regenerated plants were transferred to MS (Murashige and Skoog, 1962) medium with 3.0 g/L Phytigel. The plants with a height of 10 cm were removed from culture medium, washed their roots, placed in pots with soil and cultured in *ex-vitro* environment under natural conditions. T₁ seeds were obtained by self-pollination of primary transformed rice (T₀) plants. The seeds were used for studying the segregation of the *gus* gene in T₁ progeny. Eighteen lines were randomly selected, six of each promoter in study. The seeds per line were germinated on MS culture medium to obtain plants of T₁ progeny, which were tested by histochemical GUS assay.

Histochemical GUS assay in rice tissues

GUS assay was performed as described by Jefferson (1987). Rice tissues (leaves, stem, roots and seeds) were transferred to eppendorf tubes containing GUS staining solution (50 mM sodium phosphate at pH 7.0, 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 1 mg/ml X-Gluc, 0.1 mM potassium ferricyanide, 0.1 mM potassium ferrocyanide and 20% methanol) and incubated at 37°C until the apparition of blue spots. The staining solution was then removed, and the tissues were stored in 70% ethanol. Tissues were examined under a stereoscopic microscope.

Fluorimetric GUS assay

Leaves, stems and roots of six *ex vitro* rice plants were ground separately with liquid nitrogen. Protein extrac-

tion buffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 7.0, 0.01% SDS, 0.01 M EDTA, pH 8.0, 0.1% Triton X-100 and 10 mM mercaptoethanol) was added to the frozen tissue powder (~100 mg) and vortexed to homogeneity. The homogenate was centrifuged at 11 000 g for 15 min at 4°C. The total soluble proteins in the supernatant were quantified by Bradford method and used for fluorimetric assay.

Fluorimetric GUS assay was performed in 500 µl of reaction, consisted of 400 µl of protein sample in extraction buffer and 100 µl of 10 mM 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (4-MUG). The reaction was incubated at 37°C. At zero time, an aliquot of 50 µl reaction was taken out and added to 450 µl 0.2 M sodium carbonate. The same manipulation was performed at subsequent times: 5, 10, 15, 20, 25 and 30 minutes.

MUG is cleaved by GUS to release methylumbelliferone (MU) and glucuronic acid. MU fluorescence was quantified in spectrofluorometer using excitation and emission wavelengths of 365 and 455 nm, respectively. Values were calculated according to a reference range of MU. Each sample was analyzed in triplicate. Fluorimetric assessments of GUS activity were expressed in terms of nmol of MU produced per minute per microgram of protein.

GUS activity in polyacrylamide denaturing gel

The electrophoretic run of the non heated samples (total soluble proteins extracted from leaves of regenerated plants) was performed in 10% polyacrylamide denaturing gel. After that, the gel was incubated 1h with 50 mL Triton X-100 2.5 % v/v in water, to renature the enzyme, and then was incubated with 10 mL of histochemical staining solution at 37°C, until it appeared the blue-stained bands. Total soluble proteins from leaves of tobacco transplomatic plant, with verified GUS activity in chloroplasts, were used as positive control. The tobacco transplomatic plant was provided by Molecular Biology Laboratory of Center for Genetic Engineering and Biotechnology of Sancti Spiritus, Cuba.

Statistical analysis

In the segregation analysis of *gus* gene to T₁ progeny, the numbers of GUS positive and GUS negative plants were processed by a Chi-square goodness of fit test (p≥0.05), using the version 11.5 of the Statistical Package for Social Sciences.

Results

Qualitative GUS activity of *in vitro* rice tissues

After 72 hours of the bombardment, the histochemical GUS assay did not show visible differences between

the calli bombarded with three promoters under study. In all cases small and isolated blue spots on the outermost layer of calli were observed. However, the GUS staining patterns in calli cultured during 7 days after the bombardment were different, depending on the promoter used to drive the GUS expression. Callus tissues transformed with A9 promoter showed large and numerous blue-staining areas (Fig 1A), whereas with the Ubi1 promoter the blue areas were smaller and more isolated (Fig 1B), similar to the results obtained with the 35S promoter (Fig 1C).

In plants regenerated from transformed calli the constitutive expression of *gus* gene drove by three promoters was verified: GUS staining was confirmed in leaves, stems and roots of all the plants. But some differences were observed in the staining pattern depending on

the promoter. Using A9 promoter, GUS activity was qualitatively higher in all plant organs; the roots dyed completely (Fig 2A), the blue color was more intense in leaves and stems, and the blue stain was spread to the substrate solution. The blue staining was detected in all the organs of the plants Ubi1-GUS and 35S-GUS, but it was less intense than in A9-GUS plants: the figures 2B and 2C show the blue roots after the histochemical reaction.

The blue-stained bands in polyacrylamide denaturing gel with renatured enzyme were observed after 30 minutes of gel incubation on histochemical staining solution at 37°C (Fig 3). The active form of the enzyme is a tetramer of four identical subunits (Jefferson, 1987). The wider band (lane 6) corresponded to protein extract from tobacco transplomatic plant, where the

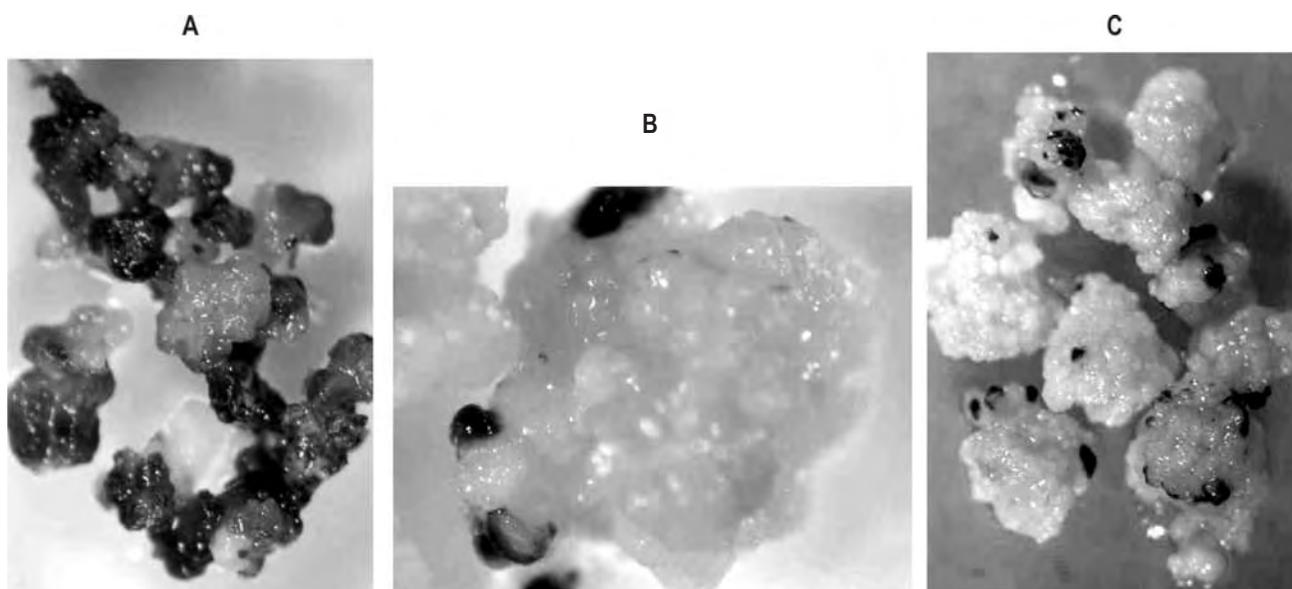


Figure 1. Patterns of histochemical GUS activity in rice callus, transformed with (A) pA9GUS (B) pUbiGUS and (C) p35SGUS, 7 days after bombardment.

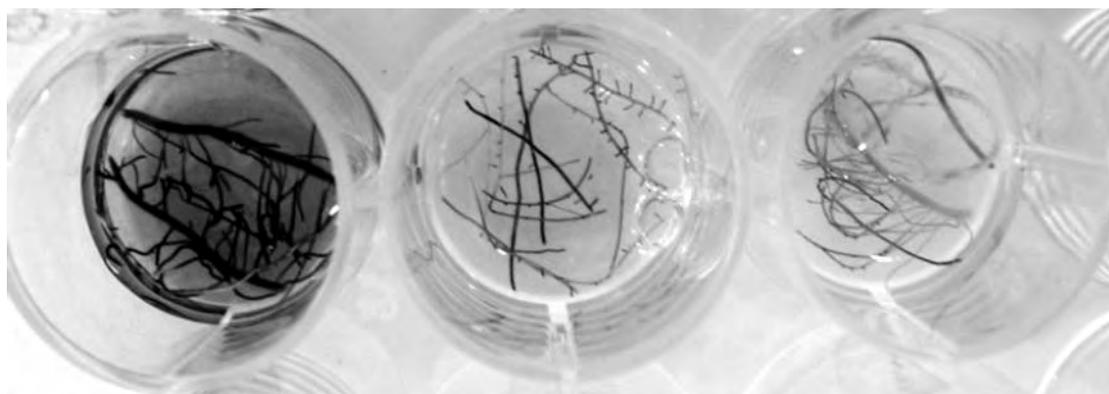


Figure 2. Histochemical GUS activity in roots from regenerated plants, transformed with (A) pA9GUS, (B) pUbiGUS, (C) p35SGUS.

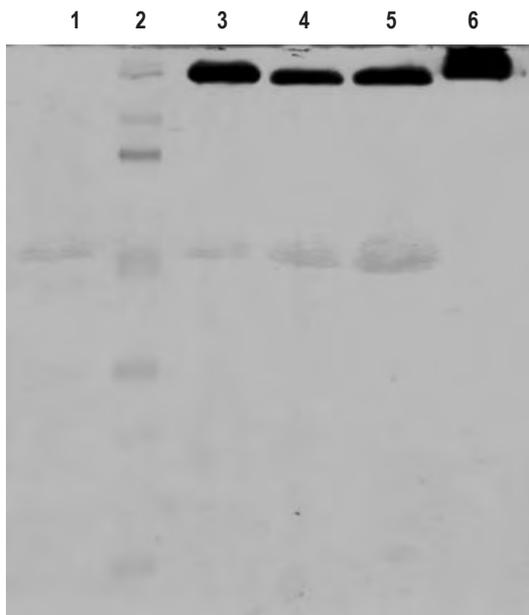


Figure 3. GUS activity in electrophoresis of polyacrylamide denaturing gel of non heated samples (total soluble proteins extracted from leaves of regenerated plants). Lanes: (1) Non-transformed plant, (2) AppliChem Protein Marker III, (3) plant transformed with pA9GUS, (4) with pUbiGUS, (5) with p35SGUS, and (6) positive control (GUS activity in tobacco transplasmic plant)

GUS activity was higher (positive control), because it is in chloroplasts. Chloroplast has been exploited as a powerful prokaryotic-like expression platform for the production of heterologous proteins (Rasala and Mayfield, 2014). The other wide band (lane 3) corresponded to the protein extract from rice plants transformed with pA9GUS, which confirm previous results that had shown increased qualitative GUS activity with A9 promoter, compared with the others two promoters.

Qualitative GUS activity in *ex vitro* plants

The acclimatization of plants to the *ex vitro* environment was successful, considering that 98% of them survived and seeds set under the established conditions.

GUS activity during *ex vitro* vegetative growth was examined in sections of leaves, stems and roots which had been treated with the chromogenic GUS substrate X-Gluc.

The pattern of activity conferred by the 35S promoter in *ex-vitro* plants was studied first and used as a reference. Histochemical staining of the aerial part of these plants revealed the staining of vascular tissues in stems and leaves. The intensity of staining increased as the leaves were older. The primary root, the root cap and the cross sections were deep blue, whereas the elongation zone was less stained.

Like the 35S, the A9-GUS plants exhibited a constitutive pattern of expression in leaves, stems and roots. The stems sections were stained deep blue; the intense staining of the leaves vascular tissue was also observable. The intensity of the color increased with the age of the leaves, suggesting a constitutive and high GUS expression. The main root exhibited reporter gene activity even in the elongation zone and the secondary roots were completely dark blue.

Transgenic plants harboring Ubi1-GUS showed a much lower blue staining unevenly distributed. Longitudinal shoot sections revealed that the indigo staining was restricted to young leaves bases. In the primary root, the β -glucuronidase activity was confined to the root tip in a region that might correspond to the meristem and the elongation zone.

Quantitative GUS expression

To support the differences observed in qualitative GUS expression in plants transformed with three promoters, fluorimetric activity was quantified and more accurate comparable results were achieved.

In agreement with the results of the qualitative GUS activity, the highest values of fluorimetric activity were found with the *gus* gene drove by A9 promoter. In leaves the fluorimetric GUS activity had the maximum average, 2.5 nmol MU/min.mg protein. In stems the activity ranged from 2.09 to 2.88 nmol MU/min.mg protein, and in roots ranged from 2.1 to 2.28 nmol MU/min.mg protein (Fig. 4).

An average of 1.43 nmol MU/min.mg protein was calculated for the fluorimetric GUS activity among leaves, stems and roots of plants transformed with 35S promoter was. Qualitatively, there were not visible differences in GUS expression in plants transformed with the A9 and 35S promoters. However, quantitative assay confirmed that A9 promoter effectiveness was 1.74 fold higher than the 35S in the three tissues.

GUS activity recorded in leaves and stems transformed with the Ubi1 promoter averaged 2-fold lesser activity than that of the A9 promoter. As in qualitative assay, GUS expression in roots was slight in the six plants, and the fluorimetric activity ranged only between 0.09 and 0.13 nmol MU/min.mg protein (Fig 4).

Segregation of *gus* gene to T_1 progeny

All plants were capable to produce healthy and fertile seed of T_1 progeny three months after the transplant to *ex vitro* environment. The GUS assay was conducted in manually dehulled seeds and in longitudinal sections of the seeds.

The penetration of the substrate in the intact seeds was limited, so only small blue spots were observed in the external coating of them. The blue staining was detec-

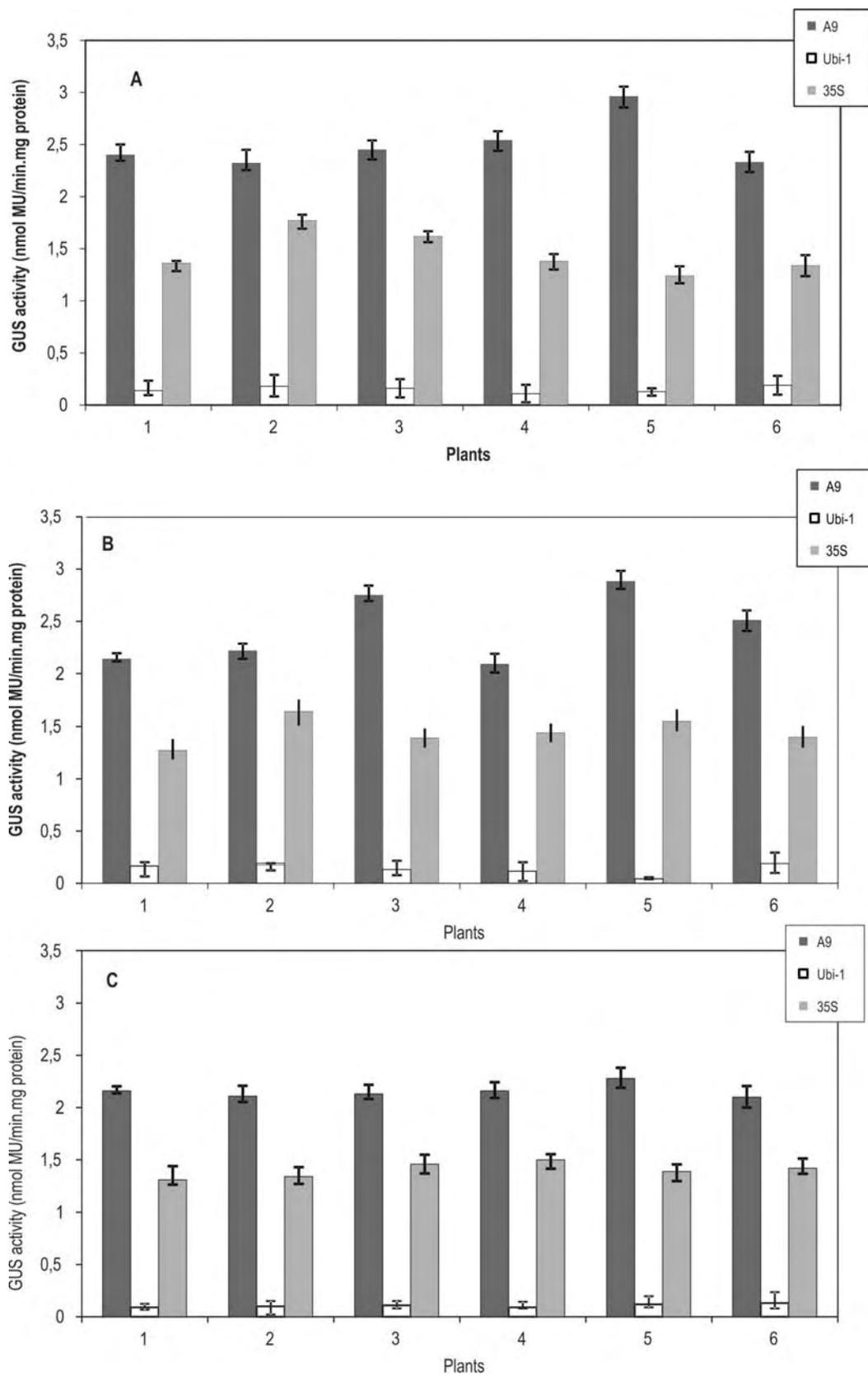


Figure 4. Fluorimetric GUS activity in leaves (A), stems (B) and roots (C) from six *ex vitro* transgenic rice plants, transformed with the constitutive promoters: A9 (dark bars), Ubi1 (white bars) and 35S (light gray bars)

ted rapidly in the embryos from seeds harboring the pA9GUS. Embryos transformed with p35SGUS y pU-biGUS were stained one hour later. The histochemical staining was completely distributed in the starchy endosperm of the longitudinal sections of the seeds (Fig 5).

Segregation analysis of the *gus* gene was performed in eighteen independent lines of T₁ progeny. Plants germinated on MS culture medium were subjected to histochemical GUS assays. Results indicated that 17 of 18 evaluated lines segregated the *gus* gene to T₁ progeny in a Mendelian form. Only the line 35S-4 had not complied with a ratio 3:1 GUS positive/GUS negative (Table 1).

Discussion

The promoter plays the most important role in determining the temporal and spatial expression pattern and gene transcript, although the final amount of gene product is determined at both the transcriptional and post-transcriptional levels (Qu *et al.*, 2008). To date, some strong constitutive promoters, such as the cauliflower



Figure 5. Histochemical GUS activity in longitudinal sections of seeds from plants transformed with the A9, Ubi1 and 35S promoters.

mosaic virus 35S promoter and maize Ubiquitin-1, are widely used in plant biotechnology research.

The *gus* gene is commonly used to evaluate the activity of gene promoters. Qu *et al.* (2008) examined the activity of six glutelin promoters fused to *gus* gene, in

Table 1. Segregation of the *gus* gene in T₁ generation of eighteen independent transgenic rice lines, transformed with *gus* fused to different promoters: A9, Ubi1 and 35S. Data were processed using a Chi-square goodness of fit test ($p \geq 0.05$).

Lines	n	Expected ratio (3:1)		Observed ratio		p	χ^2
		GUS (+)	GUS (-)	GUS (+)	GUS (-)		
A9-1	30	22,5	7,5	19	11	0,084	2,981
A9-2	30	22,5	7,5	25	5	0,291	1,111
A9-3	30	22,5	7,5	25	5	0,291	1,111
A9-4	30	22,5	7,5	22	8	0,833	0,044
A9-5	30	22,5	7,5	26	4	0,14	2,178
A9-6	33	24,75	8,25	28	5	0,191	1,707
Ubi1-1	30	22,5	7,5	21	9	0,327	0,4
Ubi1-2	30	22,5	7,5	19	11	0,084	2,981
Ubi1-3	30	22,5	7,5	20	10	0,291	1,111
Ubi1-4	32	24	8	22	10	0,414	0,667
Ubi1-5	30	22,5	7,5	21	9	0,327	0,4
Ubi1-6	30	22,5	7,5	23	7	0,833	0,044
35S-1	30	22,5	7,5	24	6	0,291	1,111
35S-2	32	24	8	23	9	0,683	0,167
35S-3	31	23,25	7,75	26	5	0,254	1,301
35S-4	30	22,5	7,5	14	16	0,0001	15,093
35S-5	30	22,5	7,5	20	10	0,291	1,111
35S-6	30	22,5	7,5	25	5	0,291	1,111

order to develop diverse promoters to drive multigene expression while avoiding the problem of homology-based gene silencing in transgenic rice. Xiao *et al.* (2005) used *gus* gene for the isolation and characterization of a novel plant promoter that directs strong constitutive expression of transgenes in plants. The authors demonstrated that the promoter could lead to GUS expression at various developmental stages and in different tissues and organs, similar results to those obtained in the present work.

The promoters *CaMV35S*, *A9* and *Ubi1* were found to be active in the whole J-104 rice plant body or in various tissues and/or stages of plant growth, with distinct patterns of relative activity. Qualitative and quantitative analysis of GUS activity demonstrated that GUS expression is higher under *A9* promoter. Although it is considered to be a strong constitutive promoter, the expression of genes regulated by *CaMV-35S* promoter can be modulated by photoperiod, temperature and the developmental stage (Obertello *et al.*, 2005). That could be a reason for which the GUS expression under *35S* in *ex vitro* plants was minor in some organs, compared with the GUS expression under *A9* promoter that was better in whole plant and growth stages.

Since the ubiquitin genes are expressed in almost all plant tissues in their native context, their promoters should drive constitutive gene expression in transgenic plants especially of the same species. Characterization of transgenic plants containing different ubiquitin promoters to date have revealed that these promoters drive gene expression preferentially in young tissues, vascular tissues and pollen grains (Plesse *et al.*, 2001).

Histochemical localization of GUS activity revealed that *Ubi1* was most active in rapidly dividing cells. This promoter is expressed in many, but not all, rice tissues and undergoes important changes in activity during the development of transgenic rice plants (Cornejo *et al.*, 1993). We verified that, in *ex vitro* conditions, transgenic rice plants harboring *Ubi1-GUS* showed a much lower blue staining that was, in addition, irregularly distributed. It was not detected the constitutive GUS expression in old *ex vitro* plants, in which the reduction or absence of GUS activity in leaves and roots in this growth stage was demonstrated.

Hernandez *et al.* (2009) have reported that the ubiquitin promoters typically show high activity in young tissues, like the blue staining detected in all in the organs of the *Ubi1-GUS* plants during *in vitro* regeneration process, or in active dividing tissues like the primary root, where the β -glucuronidase activity was confined to the root tip in a region that might correspond to the meristem and the elongation zone.

Differing with the *Ubi1* promoter, the *A9* not only achieved high constitutive GUS activity *in vitro* and in young tissues, but also in *ex vitro* plants with old leaves, mature roots and reproductive status, which is

convenient if is necessary to express agronomically important traits.

The penetration of GUS staining solution in the starchy endosperm of dehulled seeds was limited, due to the hardness of the external coating of the seeds. Only small blue spots were observed in areas where may have been wounded during the manual shelling. In the longitudinal sections of the seeds, the blue product occupied the entire area subjected to the histochemical reaction. It was interesting to note that *A9*, *Ubi1* and *35S* showed the same expression pattern and activity in the endosperm and aleurone layer of the seeds, but the embryos from seeds transformed with the *A9* promoter were deep blue rapidly after the incubation at 37°C with the substrate. For these reasons, we concluded that the *A9* promoter is very active in the whole rice grain: embryo, endosperm and aleurone layer. A similar result was described by Park *et al.*, in 2010, whose *R1G1B* promoter was reported as the first constitutive gene promoter that was active in the entire rice grain.

The Chi-square goodness of fit test allowed to assess between expected and observed segregation patterns. In the majority of the lines, *gus* gene was inherited in a expected 3:1 Mendelian ratio. Satoto *et al.* (2008) demonstrated that if the gene is dominant and inserted in one locus, it will follow a 3:1 Mendelian segregation pattern for a single dominant gene in the subsequent generation, since rice is primarily self-pollinated plant. For further use in the breeding programs, it is important to ensure that the transgene is dominant and inherits in a stable and predictable manner.

Conclusions

The promoters *CaMV35S*, *A9* and *Ubi1* were found to be active in the whole J-104 rice plant body or in various tissues and/or stages of plant growth, with distinct patterns of relative activity.

The *A9* promoter direct significantly higher levels of GUS expression in J-104 rice tissues and growth stages.

References

- Basu, C., Kausch, A.P., Chandlee, J.M. (2004). Use of beta-glucuronidase reporter gene for gene expression analysis in turfgrasses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320, 7-10.
- Cornejo, M.J., Luth, D., Blankenship, K.M., Anderson, O.D., Blechl, A.E. (1993). Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant Molecular Biology*, 23, 567-81.
- Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Chen, H., Yin, K.C., Chu, C.Y. (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica*, 18, 659-68.
- He, C., Lin, Z., McElroy, D., Wu, R. (2009). Identification of a rice *actin 2* gene regulatory region for high-level expression of transgenes in monocots. *Plant Biotechnology Journal*, 7, 227-39.
- Hernandez, C.M., Martinelli, A.P., Bouchard, R.A., Finer, J.J. (2009). A soybean (*Glycine max*) polyubiquitin promoter gives strong

- constitutive expression in transgenic soybean. *Plant Cell Reports*, 28, 837-49.
- Jang, I.C., Choi, W.B., Lee, K.H., Song, S.I., Nahm, B.H., Kim, J.K. (2002). High-level and ubiquitous expression of the rice cytochrome c gene OsCc1 and its promoter activity in transgenic plants provides a useful promoter for transgenesis of monocots. *Plant Physiology*, 129, 1473-81.
- Jefferson, R.A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5, 387-405.
- Lu, J., Sivamani, E., Li, X., Qu, R. (2008). Activity of the 5' regulatory regions of the rice polyubiquitin rubi3 gene in transgenic rice plants as analysed by both GUS and GFP reporter genes. *Plant Cell Reports*, 27, 1587-1600.
- McElroy, D., Zhang, W., Cao, J., Wu, R. (1990). Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *The Plant Cell*, 2, 163-71.
- Murahige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-97.
- Obertello, M., Santi, C., Mame-Oureye, S., Laplaze, L., Auguy, F., Bogusz, D. (2005). Comparison of four constitutive promoters for the expression of transgenes in the tropical nitrogen-fixing tree *Allocasuarina verticillata*. *Plant Cell Reports*, 24, 540-48.
- Park, S.H., Yi, N., Kim, Y.S., Jeong, M.H., Bang, S.W., Choi, Y.D. (2010). Analysis of five novel putative constitutive gene promoters in transgenic rice plants. *Journal of Experimental Botany*, 61, 2459-67.
- Plesse, B., Criqui, M.C., Durr, A., Parmentier, Y., Fleck, J., Genschik, P. (2001). Effects of the polyubiquitin gene Ubi.u4 leader intron and first ubiquitin monomer on reporter gene expression in *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology*, 45, 655-67.
- Pérez Bernal, M., Delgado, M., Hernández, C., & Armas, R. (2007). Morphological evaluation of shoots regenerated from hygromycin-resistant rice callus (cv. IACuba-28). *Colombian Journal of Biotechnology*, 9(1), 35-40.
- Qu, L.Q., Xing, Y.P., Liu, W.X., Xu, X.P., Song, Y.R. (2008). Expression pattern and activity of six glutelin gene promoters in transgenic rice. *Journal of Experimental Botany*, 59, 2417-24.
- Rasala, B.A. and Mayfield, S.P. (2014). Photosynthetic biomanufacturing in green algae: production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. *Photosynthesis Research*, 123, 1-13.
- Satoto, J.S., Hartana, A., Slamet-Leodin, I.H. (2008). The segregation pattern of insect resistance genes in the progenies and crosses of transgenic Rojolele rice. *Indonesian Agricultural Journal*, 9, 35-43.
- Stam, M., Mol, J.N.M., Kooter, J.M. (1997). The silence of genes in transgenic plants. *Annals of Botany*, 79, 3-12.
- Taylor, M.G. and Vasil, I.K. (1991). Histology of, and physical factors affecting, transient GUS expression in pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R.Br.) embryos following microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports*, 10, 120-25.
- Wang, J. and Oard, J.H. (2003). Rice ubiquitin promoters: deletion analysis and potential usefulness in plant transformation systems. *Plant Cell Reports*, 22, 129-34.
- Xiao, K., Zhang, C., Harrison, M., Wang, Z.Y. (2005). Isolation and characterization of a novel plant promoter that directs strong constitutive expression of transgenes in plants. *Molecular Breeding*, 15, 221-231.

Desempeño del crecimiento y sobrevivencia de larvas de *Oreochromis ssp.* utilizando un probiótico en el alimento

Growth performance and survival of *Oreochromis ssp.* larvae using a probiotic in the feed

Lara Mantilla C.†*, J. Vellojín Furnieles**, D. García Pérez***, V. Pertúz Buelvas****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57717

Resumen

Se evaluó la eficiencia de un bio-preparado con características probióticas como promotor del crecimiento y sobrevivencia de la tilapia roja *Oreochromis ssp.* durante la inversión sexual. A través de cuatro tratamientos, bajo un diseño completamente aleatorizado, fueron sembradas cuatro larvas L⁻¹ en acuarios de 20 L, a las cuales se les suministró, durante 45 días, alimento comercial hormonado de 45% de PB, más la adición del bio-preparado compuesto por caldo extracto de malta y una levadura del género *Saccharomyces* en concentraciones de: 10⁴ (T1), 10⁶ (T2), 10⁸ UFC ml⁻¹ (T3) y un control (T4) sin la adición del bio-preparado. Al inicio y al final del experimento se pesaron (mg), midieron (cm) y contaron las larvas. Los parámetros físicos y químicos monitoreados del agua, se mantuvieron dentro de rangos considerados normales para la piscicultura de la especie. Los mayores valores para las variables de crecimiento de las larvas se registraron en el T2 y T3; Peso final (Pf) (305.9±113.2 y 326.1 ±79.5mg), Ganancia en peso (Gp) (299.2±113.2 y 319.4±79.5mg) Longitud final (Lf) (2.5±0.3 y 2.5±0.2cm), Ganancia en longitud (Gl) (1.7±0.3 y 1.7±0.2cm) y Tasa específica de crecimiento (G) (12.5±0.7 y 12.7±0.5%/día), así mismo, los mayores valores de sobrevivencia (S) de las larvas se registraron en el T3 (68.1±6.8%) y T2 (59.4±20.2%). Por tanto los mejores resultados se presentaron en larvas de T2 y T3, a los cuáles se les suministró el bio-preparado, demostrando que las larvas de tilapia roja presentan mejor crecimiento y sobrevivencia con la implementación de un bio-preparado probiótico.

Palabras clave: cíclidos, probiótico, omnívoro, *Saccharomyces sp.*

Abstract

The efficiency of a bio-prepared with probiotic characteristics was evaluated for promoting growth and survival of red tilapia *Oreochromis ssp.* during sexual inversion. Through four treatments, under a completely randomized design were seeded four larvae L⁻¹ in aquariums of 20 L, to which they were delivered, for 45 days, with Hormone commercial food of 45% CP, plus the addition of bio -prepared composed for malt extract broth and a yeast of the genus *Saccharomyces* in concentrations: 10⁴ (T1), 10⁶ (T2), 10⁸ CFU ml⁻¹ (T3) and (T4) control without the addition of bio-prepared. At the beginning and end of the experiment the larvae were weighed (mg), measured (cm) and counted. The physical and chemical parameters monitored water remained within ranges considered normal for fish species. The highest values for the variables of larval growth were recorded in the T2 and T3; Final weight (Pf) (305.9 ± 113.2 and 326.1 ± 79.5mg), weight gain (Gp) (299.2 ± 113.2 and 319.4 ± 79.5mg) Final Length (Lf) (2.5 ± 0.3 and 2.5 ± 0.2cm), Gain length (Gl) (1.7 ± 0.3 and 1.7 ± 0.2cm) and specific growth rate (G) (12.5 ± 0.7 and 12.7 ± 0.5% / day), likewise, the highest values of survival (S) of the larvae were recorded in T3 (68.1 ± 6.8%) and T2 (59.4 ± 20.2%). Therefore the best results were presented in larvae of T2 and T3, to which were given the bio-prepared, showing that the larvae of red tilapia have better growth and survival with the implementation of a bio-prepared probiotic.

Key words: cichlid, probiotic, omnivore, *Saccharomyces sp.*

Recibido: diciembre 15 de 2015

Aprobado: mayo 16 de 2016

* (q.e.p.d) Ph.D., Grupo de investigación de Biotecnología (GRUBIODEQ). Departamento de Química. Universidad de Córdoba. Córdoba. Colombia. E-mail: lara_mantilla_cecilia@hotmail.com

** Profesional en Acuicultura. Grupo de investigación de Biotecnología (GRUBIODEQ). Programa de Acuicultura. Universidad de Córdoba. Córdoba. Colombia. E-mail: jurleyvelojin14@hotmail.com

*** Profesional en Acuicultura. Grupo de investigación de Biotecnología (GRUBIODEQ). Programa de Acuicultura. Universidad de Córdoba. Córdoba. Colombia. E-mail: dianagarcia2709@hotmail.com

**** MSc. Centro de Investigación Piscícola (CINPIC). Programa de Acuicultura. Universidad de Córdoba. Córdoba. Colombia. E-mail: vipertuz@hotmail.com

Introducción

Las tilapias son consideradas actualmente las especies de mayor importancia en los sistemas industriales de producción en el mundo, por sus características favorables de adaptación a un amplio rango de condiciones ambientales, habilidad para crecer en cautiverio con sistemas de alimentación artificiales, fácil reproducción, resistencia a enfermedades, tolerancia y desarrollo en condiciones de altas densidades (Agilar, 2010). Son clasificadas como omnívoro, por consumir diversidad de alimentos naturales, basados en algas y otros organismos acuáticos microscópico ricos en proteínas, minerales, lípidos y vitaminas necesarios para su desarrollo (Sauceda *et al.*, 2009).

En los últimos años se han realizado investigaciones orientadas a mejorar la producción de las tilapias, en aspectos relacionados con inversión sexual, nutrición, sanidad y genética (Torres *et al.*, 2010), esto ha permitido mejorar los rendimientos en sistemas de producción intensivos (DANE, 2014), sin embargo el manejo de altas densidades de siembra desequilibran y alteran la capacidad de resistencia y adaptación fisiológica de los organismos, provocando estados de estrés aprovechados por patógenos oportunistas, desencadenando enfermedades que ocasionan pérdida económicas (Jiménez, 2010).

Esto es más evidente durante la inversión sexual, cuando las larvas de tilapia son más susceptibles a estos problemas, considerando que su flora intestinal es un ecosistema muy complejo que se encuentra en constante cambio desde el inicio de la alimentación exógena, cuando las especies empiezan a filtrar diversas partículas que se van adhiriendo al organismo formando una película protectora. La colonización de flora intestinal es un proceso gradual que está influenciado por la presencia de diferentes enzimas digestivas y por la dieta ingerida, sufriendo varias colonizaciones antes del establecimiento de una población “madura” capaz de proteger al hospedero de las agresiones de patógenos. Por lo tanto el control de la alimentación de las larvas empleando probióticos puede mejorar los procesos de digestión, inmunidad y resistencia a enfermedades (Monroy *et al.*, 2012).

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se administra en cantidades adecuadas, confieren un beneficio al hospedero, modifican la comunidad microbiana relacionada con él o con el ambiente donde éste se desarrolla, a través del mejor uso del alimento, aprovechando su valor nutricional, incrementando la respuesta inmune a las enfermedades y mejorado la calidad del ambiente. (Kesacordi-Watson *et al.*, 2008). Los probióticos en acuicultura son de gran importancia por que modifican y mejoran la microbiota intestinal, son fuente de energía y nutrientes, compiten con bacterias causante de enfermedades por sitio de adhesión y además, inhiben la presencia de microorganismos patógenos estimulando la respuesta inmune

del sistémica local, celular y humoral, aumentando la resistencia a infecciones de lactococosis, streptococosis, vibriosis y furunculosis y aportando moléculas de importancia fisiológica para el hospedero, lo que permite obtener un mejor crecimiento, maduración del sistema digestivo, supervivencia y calidad larvaria (Tovar *et al.*, 2008).

Las levaduras del género *Saccharomyces* son utilizadas como alimento suplementario para varios tipos de animales; contiene varios compuestos inmunostimulantes tales como β -glucanos, ácidos nucleicos, oligosacáridos mananos y otros compuestos celulares, convirtiéndolo en un género con características probióticas que mejoran las condiciones de cultivo, disminuyendo la presencia de agentes patógenos en los sistemas de producción, reduciendo la tasa de mortalidad, y estimulando la digestión y absorción de nutrientes (Hoseinifar *et al.*, 2011). El objetivo de estudio fue evaluar la eficiencia de un bio-preparado con características probióticas como promotor del crecimiento y sobrevivencia de la tilapia roja *Oreochromis ssp.* durante la inversión sexual.

Materiales y métodos

Localización. La investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología, GRUBIODEQ y en el Centro de Investigación Piscícola CINPIC, (Universidad de Córdoba), ubicados en el municipio de Montería, departamento de Córdoba, Colombia.

Elaboración del bio-preparado. Se utilizó caldo extracto de malta y una levadura nativa del género *Saccharomyces* con características probióticas. Esta fue aislada de novillos de raza criolla Romosinuano del hato de Corpoica Turipana – Córdoba, Colombia y pertenece al banco de cepas del Laboratorio GRUBIODEQ. La levadura fue multiplicada a pequeña escala hasta obtener concentraciones de 10^4 , 10^6 y 10^8 UFC mL^{-1} teniendo en cuenta las condiciones de crecimiento, pH, temperatura y oxígeno.

Material biológico. En el Centro de Investigación Piscícola CINPIC, fueron instalados 16 acuarios de 20 L equipados con sistemas de aireación (aireadores y piedras difusoras) y filtros de esquina en los cuales se sembraron 4 larvas L^{-1} de tilapia roja recién eclosionadas con peso de 6.7 ± 0.9 mg y longitud de 0.7 ± 0.1 cm (media \pm STD), las cuales fueron alimentadas (por inmersión) seis veces al día durante 45 días de ensayo.

Diseño experimental. Se evaluaron tres tratamientos con cuatro replicas, utilizando alimento comercial hormonado de 45% de proteína bruta (PB) con adición del bio-preparado nativo con características probióticas a diferentes concentraciones; tratamiento 1 (T1), 10^4 UFC mL^{-1} , tratamiento 2 (T2), 10^6 UFC mL^{-1} y tratamiento 3 (T3), 10^8 UFC mL^{-1} , además se evaluó un tratamiento control (T4) con el mismo alimento sin adición del bio-preparado.

Procedimiento de recopilación de datos

Variabes de crecimiento. Se realizaron dos muestreos, al inicio y al final del ensayo, tomando el 25% de la población de cada unidad experimental. Las larvas fueron contadas y pesadas (mg) en una balanza analítica Adventure OHAUS®, medidas con la ayuda de un ictiómetro al milímetro más cercano. Con los valores promedio de peso y longitud se calculó; peso final (Pf), ganancia en peso (Gp), longitud final (Lf), ganancia en longitud (Gl) y tasa específica de crecimiento (G %/ día).

Sobrevivencia y prueba de resistencia al estrés. Al inicio y al final del ensayo las larvas fueron contadas para estimar la sobrevivencia (S). Para la prueba de resistencia al estrés, se tomaron 10 larvas por unidad experimental, se colocaron en papel absorbente por cuatro minutos y luego se devolvieron al agua, cinco minutos después fueron contadas para establecer la sobrevivencia.

Parámetros físico-químicos. La calidad del agua fue monitoreada, tomando registros diarios, de oxígeno disuelto, pH y temperatura, con ayuda de un Oxímetro YSI® 550A y un pHmetro YSI® Ph100. Mientras que semanalmente se midió amonio no ionizado (NH₃), con ayuda de un espectrofotómetro Espectronic®, Genesys 5.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar, todos las variables analizadas fueron expresadas como media \pm desviación estándar (Peso final, ganancia en peso, longitud total, ganancia en longitud, tasa de crecimiento específico, sobrevivencia y prueba de resistencia al estrés), se sometieron a pruebas de normalidad (test

de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza (test de Bartlett), a las variables que cumplieron estos supuestos se les aplicó ANOVA a una vía y prueba de rangos Múltiple para expresar diferencias estadísticas, en todos los casos $p < 0.05$ fue utilizando como criterio estadístico para establecer las diferencia significativa. Los datos fueron analizados con el programa Statgraphic plus for Windows (Statcal Graphics Corp, 1996).

Resultados y discusión

La temperatura promedio del agua del presente estudio (28 a 32 °C) se encontró ligeramente por debajo del rango reportado como adecuado para el cultivo de tilapia (Keller, 2007). Igualmente los valores de pH registrados (6.0 a 9.0) correspondieron al rango óptimo para el cultivo de la especie; considerando que valores por debajo de 4.5 y por encima de 10.5 afectan significativamente la sobrevivencia (González *et al.*, 2010). Según Bautista & Ruiz, (2011) para cultivos de tilapia roja el oxígeno disuelto debe ser mayor de 5 mg L⁻¹, esto sugiere que los registros obtenidos en el presente estudio (7.8 mg L⁻¹) no incidieron en el desempeño del cultivo. Los valores promedio de amonio no ionizado (NH₃) para cada tratamiento no sobre pasaron la concentración de 0.2 mg L⁻¹, y no presentaron riesgo para los organismos según lo indicado por González *et al.* (2010), (tabla 1).

Los mayores valores para las variables de crecimiento: Pf (305.9 \pm 113.2 y 326.1 \pm 79.5mg), Gp (299.2 \pm 113.2 y 319.4 \pm 79.5mg) Lf (2.5 \pm 0.3 y 2.5 \pm 0.2cm), Gl (1.7 \pm 0.3 y 1.7 \pm 0.2cm) y G (12.5 \pm 0.7 y 12.7 \pm 0.5%/día) se registraron en larvas de T2 y T3 (tabla 2) (figura 1), así mismo, los valores más altos de sobrevivencia (S) se registra-

Tabla 1. Parámetros ambientales. Temperatura (°C), pH, oxígeno disuelto (mg.L⁻¹), saturación de oxígeno (%) y amonio (mg.L⁻¹). (Promedio \pm SD)

Tratamiento	T °C	pH	OD (mg.L ⁻¹)	S(%)	Amonio (mg.L ⁻¹)
T1(104UFCmL ⁻¹)	27.6 \pm 1.0 ^a	7.8 \pm 0.5 ^a	7.8 \pm 0.7 ^a	98.5 \pm 8.6 ^a	0.06 \pm 0.05 ^a
T2(106UFC mL ⁻¹)	27.8 \pm 0.7 ^a	8.3 \pm 2.9 ^a	7.8 \pm 0.7 ^a	103.1 \pm 67.7 ^a	0.10 \pm 0.08 ^a
T3(108UFC mL ⁻¹)	27.7 \pm 0.7 ^a	8.2 \pm 2.9 ^a	7.8 \pm 0.7 ^a	103.1 \pm 65.6 ^a	0.09 \pm 0.11 ^a
T4(Control)	27.7 \pm 0.7 ^a	8.6 \pm 6.1 ^a	7.8 \pm 0.8 ^a	99.1 10.2 ^a	0.06 \pm 0.03 ^a

Tabla 2. Variables zootécnicas. Pesofinal (Pf), ganancia en peso (Gp), longitud final (Lf) y ganancia en longitud (Gl) de la tilapia roja *Oreochromis ssp.* (Promedio \pm SD)

Tratamiento	Pf (mg)	Gp (mg)	Lf (cm)	Gl (cm)
T1(104UFC mL ⁻¹)	248.2 \pm 93.1 ^b	241.5 \pm 93.1 ^b	2.4 \pm 0.3 ^b	1.6 \pm 0.3 ^b
T2(106UFC mL ⁻¹)	305.9 \pm 113.2 ^a	299.2 \pm 113.2 ^a	2.5 \pm 0.3 ^a	1.7 \pm 0.3 ^a
T3(108UFC mL ⁻¹)	326.1 \pm 79.5 ^a	319.4 \pm 79.5 ^a	2.5 \pm 0.2 ^a	1.7 \pm 0.2 ^a
T4(Control)	166.7 \pm 70.4 ^c	160.0 \pm 70.4 ^c	2.1 \pm 0.3 ^c	1.3 \pm 0.3 ^c

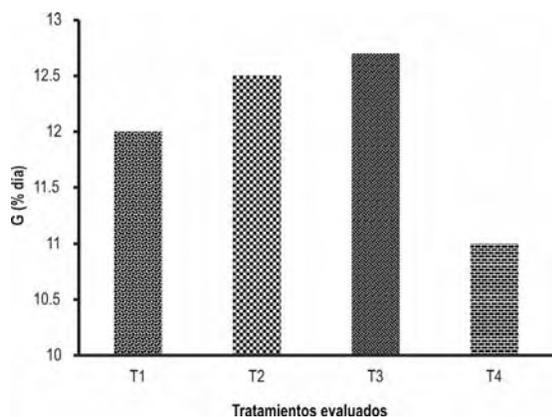


Figura 1. Tasas de crecimiento específico (G) de la tilapia roja durante la inversión sexual. (Promedio \pm SD). T1: 10^4 UFC mL⁻¹, T2: 10^8 UFC mL⁻¹, T3: 10^8 UFC mL⁻¹ de bio-preparado en el alimento concentrado, T4: (Control) alimento concentrado sin bio-preparado.

ron en las larvas de T3 (68.1 \pm 6.8%) y T2 (59.4 \pm 20.2%); mientras que los menores valores de crecimiento y sobrevivencia se presentaron en las larvas de T1 y T4 (figura 2). Para la prueba de resistencia al estrés, los valores más altos de sobrevivencia se registraron en los tratamientos con la inclusión del bio-preparado: T1 (42.4 \pm 5.0%), T2 (42.4 \pm 5.0%), T3 (62.5 \pm 9.6%); mientras que el menor valor se registró en el T4 (figura 3).

Las tilapias alimentadas con la inclusión del bio-preparado con características probióticas en el alimento concentrado, presentaron mayor desempeño productivo y mayor sobrevivencia, comparado con el tratamiento control. Se observó que existió una relación proporcional entre la concentración de los microorganismos (10^4 , 10^6 y 10^8 UFCmL⁻¹) y el crecimiento de las larvas. Sin embargo, no se observó diferencias significativas entre T2 y T3 ($p > 0.05$), indicando que los dos tratamientos son favorables como promotores de crecimiento en el inicio de la alimentación exógena de larvas de tilapia roja.

Estos resultados coinciden con los reportados por Abdel-Tawab *et al.* (2008), para larvas de tilapia nilótica (*O. niloticus*), utilizando niveles de inclusión 1 a 5 gr de levadura *S. cerevisiae* por Kg de dieta, tras un período de 12 semanas de cultivo, sometidas a desafío sanitario in vitro con *Aeromonas hydrophila*, donde se observó mejores resultados en crecimiento, aprovechamiento del alimento y sus nutrientes.

También coincide con lo observado por Lara-Flores *et al.* (2010a), quienes para alevinos de tilapia nilótica, evaluaron dos tipos de probióticos mezclados en el alimento (*S. cerevisiae* y una mezcla de *Streptococcus faecium* y *Lactobacillus acidophilus*), concluyendo que *S. cerevisiae* proporciona mejor desempeño en ganancia en peso, tasa de crecimiento específico y mejor sobrevivencia después de nueve semanas de cultivo.

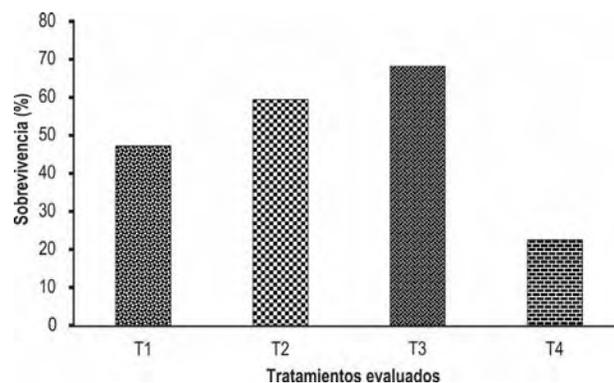


Figura 2. Sobrevivencia (%) de la tilapia roja en fase de inversión sexual. (Promedio \pm SD). T1: 10^4 UFC mL⁻¹, T2: 10^8 UFC mL⁻¹, T3: 10^8 UFC mL⁻¹ de bio-preparado en el alimento concentrado, T4: (Control) alimento concentrado sin bio-preparado.

De igual forma Hoseinifar *et al.* (2011), evaluaron los efectos de la levadura inactiva de cerveza (*S. cerevisiae*) sobre el crecimiento, respuesta fisiológica y microbiota intestinal de juveniles de Beluga (*Huso huso*) a niveles de inclusión de 1 y 2%, presentando mejores resultados en peso final, ganancia en peso, tasa específica de crecimiento y factor de conversión alimenticio en la dieta suplementada con 2% tras un período de seis semanas de cultivo.

Conclusión

Los resultados del presente estudio permiten concluir que concentraciones de 10^6 y 10^8 UFC mL⁻¹ de bio-preparado con características probióticas puede influenciar positivamente en el desempeño productivo

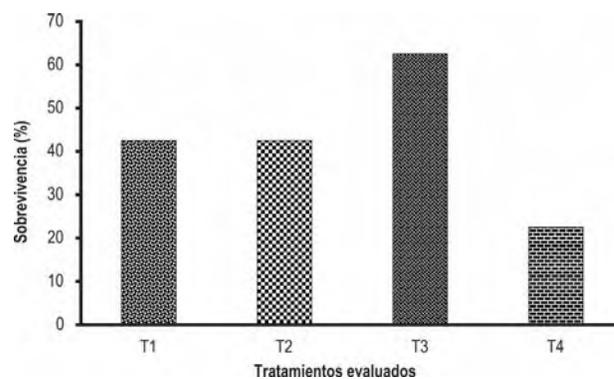


Figura 3. Sobrevivencia (%) después de la realización de la prueba de resistencia al estrés de la tilapia roja en fase de inversión sexual. (Promedio \pm SD). T1: 10^4 UFC mL⁻¹, T2: 10^8 UFC mL⁻¹, T3: 10^8 UFC mL⁻¹ de bio-preparado en el alimento concentrado, T4: (Control) alimento concentrado sin bio-preparado.

y la sobrevivencia de la tilapia roja durante la inversión sexual.

Agradecimientos

Dedicado a la memoria de la Dra. Cecilia Lara Mantilla, PhD., por su amistad, dedicación, entrega y el legado que hoy nos deja. Grupo de investigación de Biotecnología (GRUBIODEQ). Departamento de Química. Universidad de Córdoba. Córdoba. Colombia.

Agradecimiento especial al José Alonso Espinoza, MSc. por su valioso aporte en esta investigación.

Referencias bibliográficas

- Abdel-Tawwab, M., Abdel-Rahman, A., Ismael, N. (2011). Evaluation of commercial live bakers` yeast, (*Saccharomyces cerevisiae*) as a growth and immunity promoter for fry Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus*) challenged *in situ* with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 280, 185-189.
- Agilar, F. (2010). Modelos matemáticos no lineales como herramienta para evaluar el crecimiento de Tilapia roja (*Oreochromis ssp.*) y Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus* var. *chitralada*)" alimentadas con dietas peletizadas o extruidas. Tesis de Magister, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C, Colombia.
- Bautista, J., Ruiz, J. (2011). Calidad de agua para el cultivo de Tilapia en tanques de geomembrana. *Fuente*, 8, 10 – 14.
- González, R., Romero, O., y Valdivié, M. (2010). Evaluación de la calidad del agua y su influencia en el cultivo de la tilapia. Recuperado de http://www.panoramaacuicola.com/articulos_y_entrevistas/2009/03/20/evaluacion_de_la_calidad_del_agua_y_su_influencia_en_el_cultivo_de_la_tilapia_.html
- Hoseinifar, S., Mirvaghefi, A., Merrifield, D. (2011). The effect of dietary inactive brewer`s yeast *S. cerevisiae*. Ellipsoideus on the growth, psychological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). *Aquacult.*, 318, 90- 94.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). (2014). Cultivo de Tilapia roja (*Oreochromis sp*) en estanques de tierra, fuente de proteína animal de excelente calidad. Recuperado de <http://docplayer.es/14621095-El-cultivo-de-la-tilapia-roja-oreochromis-sp-en-estanques-de-tierra-fuente-de-proteina-animal-de-excelente-calidad.html>
- Jimenez, A. (2010). Detección de *Streptococcus agalactiae* por PCR en Tejidos de Tilapias rojas (*Oreochromis ssp.*) menores de 20g. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C, Colombia.
- Keller, Y. (2007). Qualidade da agua em viveiro de tilapias (*Oreochromis niloticus*): caracterização diurna de variáveis físicas, químicas e biológicas. Dissertação de Mestrado em aquíicultura e pesca. Instituto de pesca. São Paulo, Brasil.
- Kerguelén, E. (2001). Influencia de la primera alimentación en el desempeño de la larvicultura del bocachico (*Prochilodus magdalenae*). Tesis de pregrado. Universidad de Córdoba. Córdoba, Colombia.
- Kesacordi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M., Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquacult.*, 274, 1-14.
- Lara-Flores, M., Olivera-Castillo, L., Olvera-Novoa, M. (2010a). Effect of the inclusion of a bacterial mix (*Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*), and the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth, feed utilization and intestinal enzymatic activity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, 2(4), 93-101.
- Monroy, C., Castro, T., Castro, J., Castro, G., Lara, R. (2012). Beneficios del uso de probióticos en la flora bacteriana intestinal de los organismos Acuáticos. *Contacto S*, 85, 11-18.
- Sauceda, R., Rendón, P., Figueroa, E., Rendón, A., López, C. (2009). Modelo tecnológico de cultivo de Tilapia (*Oreochromis sp*). Recuperado de <http://www.tilapiademexico.org/system/publicaciones/Modelo%20Tecnol%C3%B3gico%20de%20Tilapia%20en%20Jaulas.pdf>
- Torres, J., Munoz, J., Cardenas, H., Alvarez, L., Palacio, J. (2010). Caracterización de tilapia roja (*Oreochromis ssp.*) con marcadores moleculares RAPD. *Acta Agronómica*, 59 (2), 236-246
- Tovar-Ramirez, D., Reyes-Becerril, M., Guzman-Villanueva, L., Gleavez-Lopez, V., Civere-Cerecedo, R. (2008). Probióticos en Acuicultura: Avances recientes del uso de le levaduras en peces marinos. Recuperado de http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/IX/archivos/12-Tovar.pdf

Caracterización molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de plantas de ñame de la Costa Atlántica Colombiana utilizando la técnica “DNA Amplification Fingerprinting (DAF)”

Molecular characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from yam plants of Colombia Atlantic Coast using DNA Amplification Fingerprinting technique (DAF)

Natalia Giraldo Marroquín*, Silvia Lizette Bustamante Rodríguez*,
Yeimy Alexandra Pinzón Gutiérrez*, Gustavo Buitrago Hurtado*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57720

Resumen

La antracnosis en ñame, causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, es una enfermedad relevante que posee el potencial de destruir el 100% de la cosecha, convirtiéndose en la principal limitante fitosanitaria para el rendimiento del cultivo en el país. Esta es una situación preocupante considerando que aproximadamente 35.000 familias de pequeños y medianos agricultores de la Costa Atlántica Colombiana subsisten de este cultivo; es por esto que el objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente 42 aislamientos del hongo procedentes de plantas de ñame con síntomas de la enfermedad, utilizando la técnica molecular “DNA Amplification Fingerprinting (DAF)”, caracterizada por su resolución en la determinación de la variabilidad genética de diferentes organismos. Para la determinación de polimorfismos, se amplificaron 16 marcadores DAF implementando iniciadores tipo decámero, los cuales fueron visualizados por electroforesis en microchip con el equipo MCE-202 MultiNA. Se evaluó la reproducibilidad de la técnica DAF. La amplificación arrojó 391 bandas inequívocamente polimórficas en todas las muestras, el coeficiente de Dice identificó cinco grupos con 0.30% de similaridad y el índice de diversidad genética fue de 0.28; datos que reflejan un alto grado de variabilidad en la colección estudiada de *C. gloeosporioides*. Ésta puede deberse, al intercambio de germoplasma, a su condición heterotálica, a las mutaciones y al alto potencial de dispersión de las conidias que le permiten mantener la viabilidad bajo condiciones adversas. Por último, se encontró que DAF es una técnica reproducible, confirmando que es una metodología fiable para la caracterización molecular de hongos.

Palabras clave: antracnosis, necrosis, diversidad genética, ADN, hongo.

Abstract

Yam anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, is a significant disease that has the potential to destroy harvests in 100%, causing the decrease in crop yields nationally. Consequently, its situation affects approximately 35.000 families of small farmers the Atlantic Coast for whom it is the livelihoods. Due to above, the objective of this work was to perform the molecular characterize of 42 *C. gloeosporioides* isolates from yam plants with symptoms of the disease, using the molecular technique “DNA Amplification Fingerprinting (DAF)” useful for its resolution in determining the genetic variability of different organisms. For polymorphisms determination, were amplified 16 DAF markers by using primers decamers type, the banding patron was visualized by electrophoresis in microchip 202 MCE-MultiNA equipment also, we assessed of DAF technique reproducibility. The amplification process yielded 391 unequivocally polymorphic bands in all samples, Through Dice coefficient we identified five groups with 0.30% of similarity and a genetic diversity index of 0.28. Our data show a high degree of variability in the collection of *C. gloeosporioides* studied. The high variability could be due to several reasons like germplasm exchanges, the heterothallic condition of fungal isolates, a presence of mutations and the high potential for conidia dispersal that allow it to maintain its viability under adverse conditions. Finally, we found that DAF technique is reproducible, confirming that it is a reliable methodology for the fungi molecular characterization.

Key words: anthracnose, necrosis, genetic diversity, DNA, fungi.

Recibido: septiembre 20 de 2015 **Aprobado:** mayo 20 de 2016

* Grupo de Investigación sobre el cultivo de Ñame, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. natu.giraldo@gmail.com, yeialep@gmail.com, slbustamante@unal.edu.co, gbuitragoh@unal.edu.co.

Introducción

El ñame pertenece a la familia Dioscoreaceae, la cual cuenta con seis géneros y alrededor de 600 a 900 especies, muchas de ellas de elevado potencial económico según González (2012). Es una planta monocotiledónea que se caracteriza por tener tubérculos carnosos a los que se les denomina ñames, los cuales contienen fécula abundante y metabolitos secundarios, entre los más comunes de estos compuestos están las saponinas esteroidales (Ramos et al., 2015; Acevedo et al., 2014).

Esta especie está ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales de alta pluviosidad, es utilizada principalmente en la alimentación humana en lugares como África, el sur de Asia, Islas del Pacífico y la región Caribe Colombiana; siendo producto básico en la dieta alimenticia de la población, debido a su alto contenido nutricional, donde el principal componente es el almidón, fuente rica de carbohidratos; además que su alto contenido de vitamina C le otorga valor como anti-escorbuto, constituyéndolo en un valioso alimento para hombres y animales (Pinzón et al., 2013).

El ñame de amplia distribución, engloba especies silvestres y cultivadas originarias de África, Asia y América, las cuales son sembradas en regiones tropicales, subtropicales y templadas de todo el mundo (Bustamante, 2006; Acevedo et al., 2014). En Colombia, este cultivo es importante en la Costa Caribe, el Pacífico y la Amazonía, donde, las especies de mayor importancia tanto por el área sembrada como por la demanda del tubérculo, son ñame criollo (*Dioscorea alata*) que cuenta con mejores características en cuanto a rendimiento, vigor y capacidad de almacenamiento frente al ñame espino (*Dioscorea rotundata* Poiret) que aunque no iguala las propiedades de la especie criollo, es menos susceptible a patologías devastadoras como la antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (Reina, 2012). Según Agronet (2016), en promedio, Colombia siembra 340.000 hectáreas, de las cuales se obtienen 385.000 toneladas por año.

La antracnosis es una enfermedad que ocasiona lesiones típicas necróticas en los tallos, hojas y frutos de las plantas afectadas (Cannon et al., 2012). Tiene una notable relevancia en la agricultura moderna, no solo porque posee el potencial de destruir el 100% de la cosecha, sino porque aún en los casos en que no causa pérdidas totales, por lo general, reduce en forma crónica el rendimiento del cultivo (Jiménez et al., 2012). En la Costa Atlántica Colombiana, es conocida como mancha de hierro o quemazón y afecta los rendimientos hasta en un 50% (Bustamante, 2006).

El uso tradicional de fungicidas de síntesis química logran un cierto control de la enfermedad, sin embargo, generan un impacto negativo sobre los organismos benéficos presentes en el ambiente (Almaguel & Botta,

2005), por lo anterior, los resultados han sido poco eficientes y lo que se ha logrado es aumentar problemas como la contaminación ambiental, el aumento en los costos de producción y la generación de una respuesta adaptativa del patógeno; a lo cual se le suma el inadecuado manejo del cultivo y control de *C. gloeosporioides*, debido a la poca información disponible acerca de la diversidad y estructura de la población biológica del hongo, asociada con antracnosis en ñame, lo cual permitiría un mejor entendimiento del comportamiento del patosistema *C. gloeosporioides* - Ñame (Bustamante et al., 2003; Bustamante, 2006; Pinzón, 2014).

En Colombia, se han venido desarrollando trabajos que han permitido profundizar en el conocimiento del patógeno, donde la variabilidad genética del hongo está siendo recientemente estudiada. El objetivo de este trabajo fue contribuir al entendimiento del patosistema, caracterizando molecularmente una colección de aislados de *C. gloeosporioides*, utilizando la técnica DNA Amplification Fingerprinting (DAF) y evaluando el uso de la metodología de Microchip Electrophoresis System for DNA/RNA Analysis en el equipo MCE-202 MultiNA en la amplificación de los productos.

Materiales y métodos

Material biológico

Se implementaron 42 aislamientos pertenecientes a la colección del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. Estos, fueron aislados de plantas de ñame (*Dioscorea alata* y *Dioscorea rotundata*) cultivadas en la Costa Atlántica Colombiana con síntomas de antracnosis.

Reactivación de aislados de *C. gloeosporioides*

Los hongos se encontraban conservados por la metodología de subcultivo periódico con aceite mineral a una temperatura de 4°C, con el fin de disminuir la velocidad de transferencia de oxígeno, favoreciendo la estabilidad y minimizando la frecuencia de resiembra (Pinzón et al., 2009).

Para la reactivación de los ejemplares, se hicieron repiques sucesivos de los hongos en cajas de Petri con medio PDA (Papa Dextrosa Agar) y se incubaron a 24°C en total oscuridad durante 15 días aproximadamente, brindándoles las condiciones necesarias para el crecimiento y producción de micelio para la extracción del ADN.

Extracción del ADN

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo modificado de Bustamante et al. (2003), para aislar ADN de tubérculos de ñame:

El rompimiento de la pared y membrana celular de los hongos se realizó por fricción mecánica en el perturbador celular (bead beater), durante un minuto en tubos Eppendorf de 2 mL con iguales cantidades de perlas de cristal "beads" de 0.5 mm de diámetro (Scientific Industries, Inc.) y de micelio de cada hongo. Enseguida a cada muestra, se le adicionó 400 y 20 µL de Buffer bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y DTT (ditiotreitól) respectivamente, para agitar e incubar por 30 minutos a 65°C (Bustamante *et al.*, 2003).

Posteriormente, a cada muestra se le agregó 300 µL de cloroformo: alcohol isoamílico en proporción 24:1, mezclando suavemente. La mezcla fue centrifugada por 10 minutos a 14.000 r.p.m. Para la precipitación del ADN se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se le adicionó 300 µL de isopropanol frío, la anterior mezcla se incubó a -20°C durante 60 minutos y se centrifugó por 5 minutos a 14.000 r.p.m. El ADN fue lavado dos veces con 300 µL de etanol al 70%, centrifugando por 5 minutos a 12.000 r.p.m. y descartando el etanol entre cada lavada. Finalmente, el ADN se dejó secar a temperatura ambiente por 30 minutos y fue re suspendido en 50 µL de agua tipo II.

Cuantificación del ADN

La verificación de la concentración del ADN extraído se realizó por medio de lecturas en un Fluorómetro Qubit™ con el kit de cuantificación de ADN de cadena pesada (2 – 1000 ng) de (Invitrogen®). Las concentraciones fueron ajustadas a 10 ng/µL con agua tipo II estéril.

Para confirmar la integridad del ADN se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

Caracterización molecular

Generación de patrones de bandeo de los aislados de *C. gloeosporioides* con la técnica DAF

Esta metodología considera múltiples secuencias blanco y sitios anónimos en el genoma, usando iniciadores de secuencias aleatorias tipo decámero (Caetano-Anolles *et al.*, 1991; Caetano-Anolles *et al.*, 1998).

Esta técnica se aplicó a un grupo de cuarenta y dos (42) aislados del hongo *C. gloeosporioides*, con dieciséis iniciadores tipo decámero (tabla 1). La PCR se realizó en placas multipozos, bajo las condiciones descritas en la tabla 2 y a un volumen final de 20 µL. La amplificación se realizó en un termociclador (C1000, Bio-Rad®) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min; seguido de 40 ciclos cada uno compuesto de: desnaturalización a 94°C por 15 s, hibridación a 35°C por 20 s y extensión a 72 °C por 1 min; y una extensión final a 72°C por 5 min.

Tabla 1. Secuencias de los decámeros utilizados

Iniciadores	Secuencia 5' → 3'
OPM01	GTTGGTGGCT
OPM02	ACAACGCCTC
OPM03	GGGGGATGAG
OPM04	GGCGGTTGTC
OPM06	CTGGGCAACT
OPM07	CCGTGACTCA
OPM09	GTCTTGCGGA
OPM10	TCTGGCGCAC
OPL02	TGGGCGTCAA
OPL03	CCAGCAGCTT
OPL04	GACTGCACAC
OPL06	GAGGGAAGAG
OPL07	AGGCGGGAAC
OPL08	AGCAGGTGGA
OPL09	TGCGAGAGTC
OPL10	TGGGAGATGG

Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis con microchip en el equipo MCE-202 MultiNA. Se utilizó un kit de 2.500 pares de bases y 10 µL del marcador de peso pGEM® (DNA-3 Kb), los volúmenes de los reactivos son calculados automáticamente por el equipo dependiendo del número de muestras.

Análisis de datos

Elaboración de matrices

Una vez se obtuvieron los patrones de bandeo de las muestras, se contaron todas las bandas inequívocamente identificables generadas con cada iniciador y se elaboraron matrices de datos doble estado de presencia/ausencia en Excel (Microsoft, 2007). Posteriormente, se determinaron las matrices de similaridad a partir del índice de similaridad de Dice (Nei y Li, 1979) con el programa SimQual del paquete bioestadístico NTSYS versión 2.02i (Numerical Taxonomy System) y a partir de éstas se construyeron matrices de agrupamiento con el método UPGMA (Unweighted Pair Group Arithmetic Mean) en el programa SAHN del mismo paquete estadístico.

Obtención del dendograma

El resultado del agrupamiento se graficó en el programa Tree Plot de NTSYS, el cual arrojó el dendograma

Tabla 2. Reactivos utilizados para la realización de la PCR

Reactivos	Concentración final	1 X	50 X
DNA molde	0.1 - 0.5 ng/μL	1 μL	1 μL
Buffer	1X	2μL	100μL
MgCl ₂	2.5 mM	1μL	50μL
dNTPs	0.25 mM	0.5μL	25μL
Primer	3 - 5.3 pMol	5.3μL	265μL
Taq. Polimerasa	0.2 u/μL	0.2μL	10μL
Agua tipo II		9.4μL	470μL

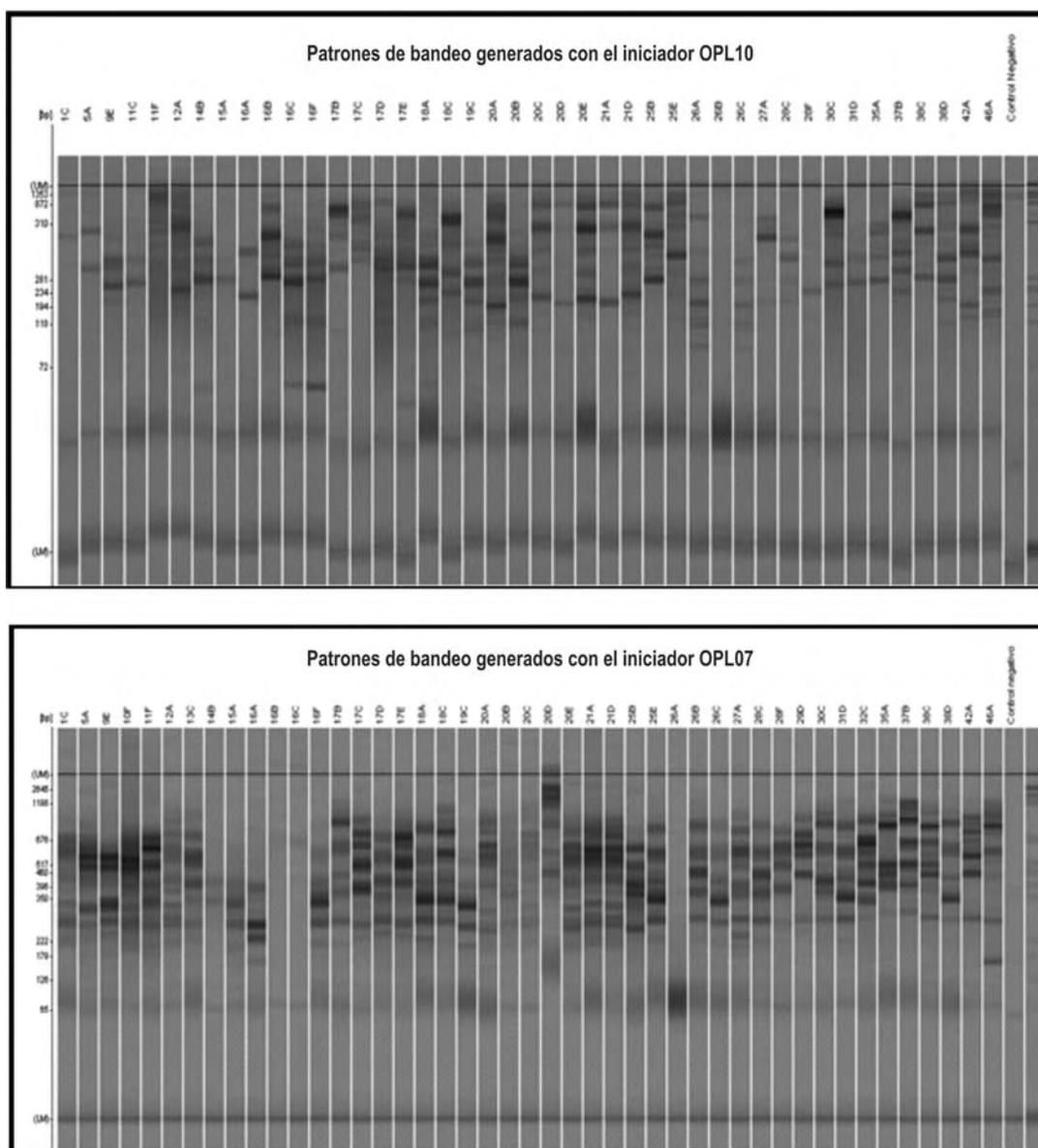


Figura 1. Perfiles DAF generados por electroforesis.

del conjunto de iniciadores para observar los grupos formados.

Estimación de la diversidad genética

La diversidad genética de la colección de aislados se evaluó teniendo en cuenta la frecuencia de variantes, a través del cálculo de la diversidad genética promedio [Hi], la cual expresa la probabilidad de que en un loci único, cualquier par de alelos escogidos al azar de la población sean diferentes entre sí (De Vicente *et al.*, 2004).

Resultados y Discusión

Extracción del ADN

Con el protocolo modificado de Bustamante *et al.*, (2003) que contempla el uso de CTAB, se logró extraer ADN genómico de forma sencilla, rápida, en gran cantidad y de buena calidad, razones importantes para desarrollar todos los experimentos y réplicas con gran eficiencia. Este protocolo de extracción es adecuado para extraer y purificar ADN de plantas y microorganismos y está especialmente indicado para eliminar los polisacáridos y los compuestos polifenólicos que, de otro modo, alterarían la pureza del ADN y por tanto, su calidad (Somma, 2010).

Este procedimiento se ha aplicado con frecuencia en estudios de genética molecular de plantas, hongos y bacterias y ha sido utilizado en el proceso de detección de Organismos Genéticamente Modificados (Lipp *et al.*, 2001).

Cuantificación del ADN

Según las mediciones de cuantificación, las concentraciones de ADN obtenidas tuvieron valores máximos entre 709 ng/μL y 206.5 ng/μL y valores mínimos entre 21.7 ng/μL y 12.2 ng/μL.

Teniendo en cuenta que la base de la mayoría de investigaciones en biología molecular depende de la obtención de ADN, se puede confirmar como reportan Rada & Taboada (1998), que esta técnica permitió la obtención de ADN de buena concentración e integridad, prerequisite importante para su uso en técnicas de biología molecular como Impresiones Digitales de ADN o Fingerprinting. Fundamentado esto, en los valores reportados anteriormente y en la eficiencia de la amplificación con marcadores moleculares tipo DAF empleados en este estudio.

Caracterización molecular

Los 16 iniciadores utilizados amplificaron regiones aleatorias con un número entre 19 y 36 bandas, con un promedio de amplificación de 24.4 bandas por iniciador (figura 1) (datos completos no mostrados por extensión del texto). El menor número de bandas se presentó en los iniciadores OPM09 con 20 y OPL10 con 19, contrario a los iniciadores OPM07 y OPL07 que presentaron el mayor número de bandas con 27 y 36, respectivamente. En total se obtuvieron 391 bandas inequívocamente polimórficas en toda la colección (tabla 3), datos que permiten inferir que los aislados estudiados presentan un alto grado de polimorfismo.

Se determinó la fiabilidad de la técnica DAF al obtenerse una buena reproducibilidad de las bandas (figura 2) (datos completos no mostrados por extensión del texto).

Análisis de agrupamiento

El dendograma obtenido por análisis de la colección mediante el coeficiente de Dice (figura 3), evidencia que a un 0.30 % de similaridad se discriminan 5 grupos, el primero conformado por 8 aislados, el segundo por 29, el tercero y cuarto con 2 aislados cada uno

Tabla 3. Total de bandas obtenidas con cada uno de los iniciadores usados.

Iniciadores	No. de bandas	Iniciadores	No. de bandas
OPM01	22	OPL02	25
OPM02	23	OPL03	27
OPM03	21	OPL04	21
OPM04	26	OPL06	26
OPM06	24	OPL07	36
OPM07	27	OPL08	25
OPM09	20	OPL09	25
OPM10	24	OPL10	19
Total de bandas		391	

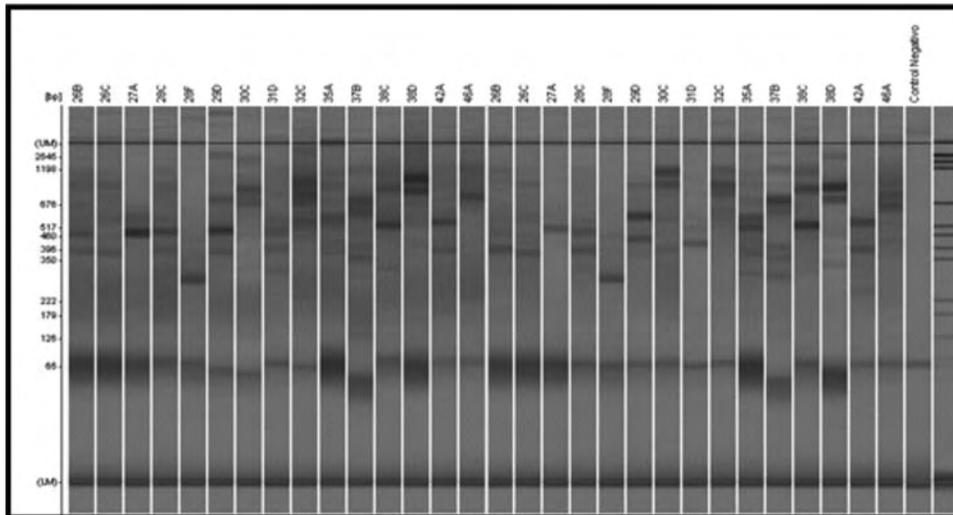


Figura 2. Evaluación de la reproducibilidad de las amplificaciones con la técnica DAF, utilizando el iniciador OPL06.

y un aislado que no se agrupó; teniendo en cuenta que los rangos de similitud se acotan de 0 a 1, donde, valores cercanos a 1 indican altos grados de semejanza y baja diversidad, mientras que cifras cercanas a 0 significan poca semejanza y gran diversidad, se puede demostrar que la colección de *C. gloeosporioides* analizada presenta muy poca similitud y alta diversidad genética, resultado que se respalda con el calculado en la estimación de la diversidad genética

(0.28) y con las 391 bandas polimórficas obtenidas de la amplificación de todos los aislados; los resultados presentados concuerdan con las investigaciones de Álvarez *et al.* (2005), donde aplicaron las técnicas moleculares: Amplificación de la región del espaciador interno transcrito (ITS) del ADNr, análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción combinado con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-RFLPs) y la amplificación aleatoria de microsatélites (RAMs) para

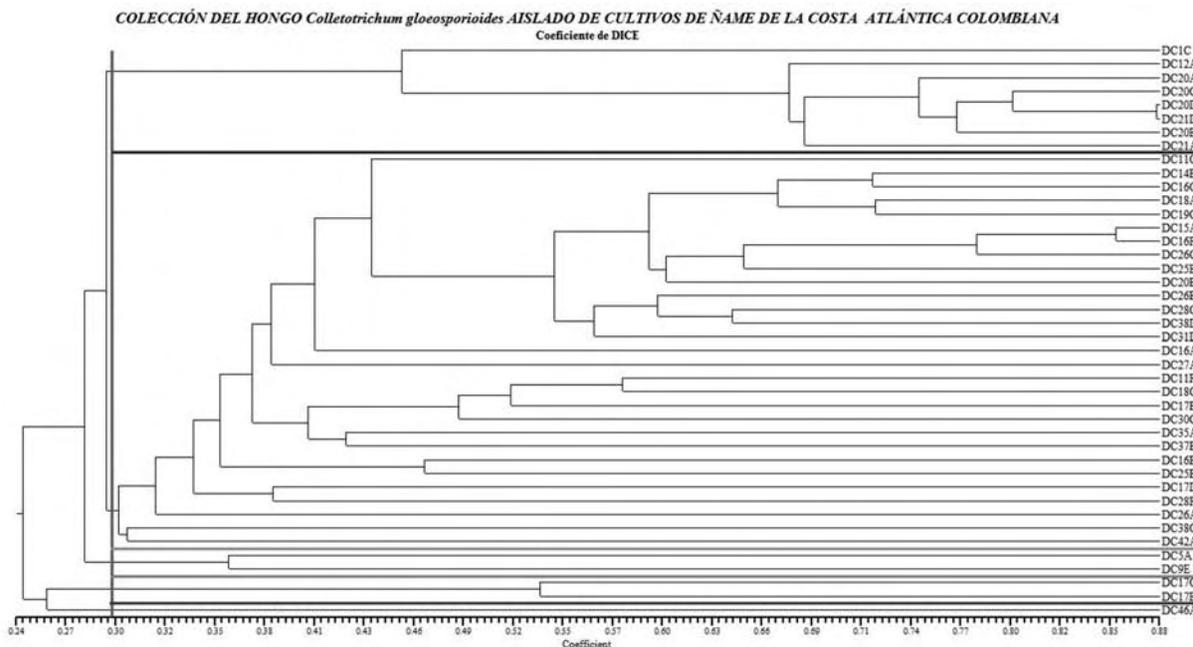


Figura 3. Dendrograma de la diversidad genética de 42 aislados del hongo *C. gloeosporioides* que afecta al cultivo de ñame, basado en el coeficiente de similitud de Dice y calculado de los datos combinados de los 16 iniciadores amplificados con la técnica DAF usando el método de agrupamiento UPGMA.

la identificación de *C. gloeosporioides* en guanábana, las cuales les permitieron determinar un alto grado de variabilidad genética a un coeficiente de similitud de 0.31; igualmente Montero *et al.*, (2010) analizaron la diversidad genética de la especie *C. gloeosporioides* en cultivos de aguacate, mediante el análisis de zimogramas isoenzimáticos y de amplificación de fragmentos de polimorfismo de ADN amplificado al azar (RAPDs), estimadores estadísticos que confirmaron la amplia variabilidad genética del patógeno, con un índice de variabilidad genética de 0.3.

El hongo *C. gloeosporioides* es uno de los hongos filamentosos biológicamente más exitosos, convirtiéndose en un modelo de estudio debido a su amplia variabilidad y poca especificidad (Bustamante, 2006), características que pueden ser evaluadas con el uso de herramientas moleculares que detectan variaciones específicas a nivel de ADN, pudiendo ser valoradas en cualquier etapa del desarrollo de las cepas sin sufrir alteraciones por los cambios medio ambientales y presentando una cantidad mayor de polimorfismos, por lo que este tipo de caracterización se constituye en un instrumento útil para la determinación adecuada de variabilidad en hongos (Rodríguez, 2007).

En los últimos años, las técnicas moleculares han facilitado la caracterización de muchos organismos, entre ellos *C. gloeosporioides*, permitiendo la realización de numerosas investigaciones enfocadas a estudiar la variabilidad genética del agente causal de la antracnosis. Bailey & Jeger (1992) reportaron un estudio de variación genética en aislados de *C. gloeosporioides* obtenidos de aguacate, papaya, plátano y mango, confirmando que hay alta variación entre aislamientos del mismo cultivo. Por otro lado, Montero *et al.*, (1998), con el marcador molecular RAPDs en frutos de aguacate en Michoacán-México, determinaron la diversidad genética de este mismo hongo, mediante la aplicación de un índice de variabilidad genética basado en la proporción de la presencia/ausencia de las bandas amplificadas sobre el número total de bandas por iniciador y obtuvieron un valor de 0.41 para *C. gloeosporioides*, concluyendo que dicha característica puede deberse a que el patógeno posee un ciclo de vida corto y reproducción de tipo sexual y asexual, confiriéndole una tasa alta de mutación y recombinación por cruzamiento.

Afanador *et al.* (2003), analizaron la diversidad genética del hongo evaluando metodologías como los AP-PCR, RAPDs-PCR y análisis de ADN mitocondrial asociado a secuencias ricas de adeninas y timinas, reportando una alta heterogeneidad y complejidad genética en cultivos de mango en Colombia, relacionadas probablemente con la presencia de un estado perfecto del patógeno (*Glomerella cingulata*).

La alta diversidad genotípica del hongo *C. gloeosporioides* en ñame fue reportada en Nigeria por Abang *et al.*, (2005), calculada a partir de las técnicas de am-

plificación de la subunidad 18S de ADNr visualizada en Denaturing Gradient Gel Electrophoresis -DGGE- y Microsatellite-primed PCR -MP-PCR-, cuyos resultados permitieron estimar diversidades de 0.25 y 0.21 para las formas más virulentas, valores concordantes con los obtenidos en la presente investigación. Para el año 2006, el mismo autor, empleando marcadores moleculares RAPDs evidenció una vez más niveles altos de variabilidad genética del hongo, revelando que la antracnosis tiene mayor incidencia y severidad en zonas de bosque húmedo, y reportando por primera vez que aislados de una misma lesión eran genéticamente diferentes.

Más recientemente, Domínguez *et al.*, (2012), realizaron la caracterización molecular de *C. gloeosporioides* causante de antracnosis en hojas, raquis y frutos de palma africana en Maracaibo-Venezuela, incluyendo pruebas de PCR específicas, secuenciación de ITS del ADNr y análisis de variabilidad mediante RFLPs y RAPDs. Dentro de los resultados obtenidos en la investigación encontraron que la variabilidad genética de la población tiene una estructura fundamentalmente clonal y que la gran heterogeneidad morfológica y la complejidad genética de la especie *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato*, puede ser explicada por la presencia de un complejo de especies polimórficas que contiene una serie de subgrupos con diferentes grados de patogenicidad, especificidad y diversidad genética, donde se incluye por lo menos a *Colletotrichum fruticola*, *C. gloeosporioides sensu stricto*, *C. siamense*, *C. asianum*, *C. hymenocallidis*, *C. horii* y *C. kahawae*. Pinzón (2014), en el trabajo, caracterización morfológica y molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de ñame (*Dioscorea* spp.) y establecimiento de una escala de virulencia para su caracterización patogénica, reporta una alta variabilidad genética de esta especie, indicando la presencia del complejo *C. gloeosporioides sensu lato* y otras especies del género involucradas en el desarrollo de antracnosis en el cultivo de ñame.

La diversidad genética permite mantener un reservorio de condiciones de variación de respuesta al medio, facilitando la adaptación y la supervivencia del individuo y como se demuestra anteriormente, ésta característica ha sido ampliamente estudiada en *C. gloeosporioides*, reportándose numerosas investigaciones aplicando diferentes técnicas moleculares, sin embargo, las causas de la variabilidad de este patógeno en ñame, aun son inciertas (Pinzón, 2014; Abang *et al.*, 2006).

Para Montero *et al.*, (2010) esto puede tener su origen en diversos factores: el intenso tráfico existente en el germoplasma genera un intercambio del hongo, que se encuentra como infección latente (síntomas no visibles) en plantas y frutos, igualmente la capacidad del hongo para reproducirse sexualmente, siendo además una especie heterotálica que incluye la meiosis como un tipo de reproducción y por consiguiente el entrecruzamiento de segmentos cromosómicos que junto

con las mutaciones, podrían ser la mayor fuente de variabilidad del mismo, cuya fase sexual *Glomerella cingulata*, es ampliamente conocida, sin tener un papel reconocido en las epidemias de antracnosis en ñame (Abang *et al.*, 2006).

Una tercera fuente de variabilidad genética, se atribuye a un alto potencial de dispersión y adhesión de las conidias y ascosporas de muchas especies del género *Colletotrichum*, las cuales están envueltas con una sustancia mucilaginoso hidrofílica, compuesta principalmente de polisacáridos y glicoproteínas de alto peso molecular, que le permite a las conidias mantener la viabilidad bajo condiciones adversas como temperaturas extremas, luz ultravioleta y baja humedad. Al mismo tiempo, protege las esporas de los materiales tóxicos producidos por los tejidos vegetales hospederos durante el desarrollo de una lesión (Bustamante, 2006).

La variación genética presente en *C. gloeosporioides* refleja la capacidad del patógeno para evolucionar y adaptarse a diferentes ambientes, aspecto que contribuye al alto grado de dificultad en el diseño de estrategias de control efectivas y duraderas, por lo que la búsqueda de variedades resistentes a la enfermedad ha sido sugerida como una estrategia potencial en el mejoramiento de la enfermedad, sin embargo, esta estrategia es apropiada si el patógeno es exclusivamente asexual y si el potencial de flujo de genes es bajo, pero si el patógeno es recombinante y tiene un alto potencial de flujo de genes, como parece ser el caso de *C. gloeosporioides* en ñame, la recombinación de alelos de virulencia puede ocurrir tan rápido que los esfuerzos pueden ponerse en riesgo (Abang *et al.*, 2003; Sanabria *et al.*, 2010; Pinzón, 2014).

Conclusiones

La colección del hongo *C. gloeosporioides* estudiada presentó un alto grado de diversidad genética, soportado esto en los valores obtenidos del índice de similitud de Dice, del índice de diversidad genética y de la amplificación, los cuales fueron, 0.30 %, 0.28 y 391 bandas completamente polimórficas en toda la colección, respectivamente.

“DNA Amplification Fingerprinting (DAF)” fue una buena herramienta para la caracterización molecular de la colección de aislados de *C. gloeosporioides* provenientes de plantas de ñame de la Costa Atlántica Colombiana, permitiendo a su vez determinar la variabilidad genética de los aislados.

Se evidenciaron diferencias importantes en la aplicación de las metodologías de amplificación: Microchip Electrophoresis System for DNA/RNA Analysis en el equipo MCE-202 MultiNA y electroforesis en geles de agarosa, dirigidas éstas a la identificación más precisa de las bandas y sus respectivos valores en la primera metodología, lo cual permite obtener datos más ajus-

tados de los perfiles de caracterización, disminuyendo el margen de error.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá por prestar las instalaciones para el desarrollo del trabajo.

Referencias bibliográficas

- Abang, M., Stephan, W., Mignouna, H., Green, K., & Asiedu, R. (2003). Molecular taxonomic, epidemiological and population genetic approaches to understanding yam anthracnose disease. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 486-496.
- Abang, M., Fagbola, O., Smalla, K., & Winter, S. (2005). Two Genetically Distinct Populations of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., causing anthracnose in Yam. *Phytopathology*, 153, 137-142.
- Abang, M., Asiedu, R., Hoffmann, P., Wolf, G., Mignouna, H., & Winter, S. (2006). Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from different yam hosts in the agroecological zones in Nigeria. *Journal Phytopathology*, 15(4), 51-61.
- Acevedo, A., Sandoval, I., & Salcedo, J. (2014). Desarrollo y productividad de ñame (*Dioscorea trifida* y *Dioscorea esculenta*) en diferentes condiciones hídricas. *Acta agronómica*, 64(1), 30-35.
- Afanador, K., Minz, D., Maymond, M., & Freeman, S. (2003). Characterization of *Colletotrichum* isolates from Tamarillo, Passiflora and Mango in Colombia and identification of a unique species of the genus. *The American Phytopathological Society*, 93(5), 579-587.
- Almaguel, L., & Botta, E. (2005). Introducción a la Acarología Agrícola: Manejo integrado de *Steneotarsonemus spinki*, Smiley. Ciudad de La Habana – Cuba. Disponible en: <http://www.inisav.cu/OtrasPub/Curso%20acarolog%C3%ADa.pdf>. Consultado el 19 de marzo de 2016.
- Álvarez, E., Ospina, C., Mejía, J., & Llano, G. (2005). Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca. *Fitopatología Colombiana*, 28(1), 1-8.
- Bailey, A., & Jeger, J. (1992). *Colletotrichum*: Biology, pathology and control. British Society for Plant Pathology - Wallingford, Oxon, UK: CAB International, p. 388.
- Bustamante, S. (2006). Estudio preliminar para la identificación de patrones de expresión génica del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Var. *Alatae* expuesto a diferentes estímulos utilizando “DD RT-PCR”. Bogotá D.C. Universidad Nacional de Colombia.
- Bustamante, S., Guzmán, M., & Buitrago, G. (2003). Caracterización molecular del germoplasma de ñame colombiano utilizando “DNA Amplification Fingerprinting (DAF)” en condiciones radiactivas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(2), 57-63.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B., & Gresshoff, P. (1991). DNA Amplification Fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology*, 9,553-557.
- Caetano-Anolles, G. (1998). DAF optimization using Taguchi methods and the effect on thermal cycling parameters on DNA Amplification. *Biotechniques*, 25, 472-480.
- Cannon, P., Damm, U., Johnston, P., & Weir, B. (2012). *Colletotrichum*—current status and future directions. *Studies in Mycology*, 73,181-213.
- De Vicente, M., López, C., & Fulton, T. (2004). Análisis de la diversidad genética utilizando datos de marcadores moleculares: Módulo de Aprendizaje. Instituto Internacional de Recursos Fitogénéticos (IPGRI) y Cornell University. Disponible en: http://www.bioviversityinternational.org/fileadmin/user_upload/onli-

- ne_library/publications/pdfs/Molecular_Markers_Volume_2_es.pdf. Consultado el 19 de marzo de 2016.
- Domínguez, I., Mohali, S., Marín, M., & Pino, H. (2012). Caracterización y variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato en plantaciones de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Venezuela. *Tropical Plant Pathology*, 37(2), 108-122.
- González, M. (2012). El ñame (*Dioscorea* spp.). Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. *Cultivos Tropicales*, 33(4), 5-15.
- Jiménez, H., Álvarez, A., Mejía, J., & Ochoa, A. (2012). Caracterización molecular de accesiones de ñame (*Dioscorea alata* L.) de la región caribe colombiana. *Revista U.D.C.A-Actualidad y Divulgación Científica*, 15(2), 323-330.
- Lipp, M., Bluth, A., Eyquem, F., Kruse, L., Schimmel, H., Van den Eede, G., & Anklam, E. (2001). Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *Technology*, 212, 497-504.
- Montero, V., Montalvo, H., Morales, G., Peña, A., Gálvez, A., & Azpiroz, R. (1998). Estimación de la variabilidad genética intrapoblacional mediante el uso de fragmentos de DNA amplificados al azar. *Agríc. Tec. Mex.*, 24(1), 83-89.
- Montero, V., Morales, J., González, M., Anaya, J., Corona, T., & Gálvez, A. (2010). Diversidad genética, patogénica y morfológica del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(2), 157-172.
- Pinzón, Y., Bustamante, S. & Buitrago, G. (2009). Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 8-18.
- Pinzón, Y., Bustamante, S., & Buitrago, G. (2013). Diagnóstico molecular diferencial *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* en ñame (*Dioscorea* sp.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(1), 52-60.
- Pinzón, Y. (2014). Caracterización morfológica y molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de ñame (*Dioscorea* spp.) y establecimiento de una escala de virulencia para su caracterización patogénica. Bogotá D.C. Universidad Nacional de Colombia.
- Rada, A., & Taboada, G. (1998). Métodos de obtención y purificación de ADN humano para su aplicación en genética molecular. *Biofarbo*, 6, 63-68.
- Ramos, V., Bustamante, S., Rincón, J., Rojas, M., Raz, L., & Buitrago, G. (2015). Identificación, establecimiento *in vitro* y análisis fitoquímico preliminar de especies silvestres de ñame (*Dioscorea* spp.) empleadas con fines medicinales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(1), 9-17.
- Red de información y comunicación del sector agropecuario: Agronet. Estadísticas cultivo de ñame. Disponible en: <http://www.agronet.gov.co/Paginas/estadisticas.aspx>. Consultado el 19 de marzo de 2016.
- Reina, Y. (2012). El cultivo de ñame en el Caribe colombiano. Banco de la República - Centro de estudios económicos regionales (CEER) - Cartagena. Disponible en: http://www.banrep.gov.co/docum/Lectura_finanzas/pdf/dtser_168.pdf. Consultado el 19 de marzo de 2016.
- Rodríguez, A. (2007). Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum* spp. asociadas a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis18.pdf>. Bogotá D.C. Pontificia Universidad Javeriana.
- Sanabria, A., Mahuku, G., Kelemu, S., Cadavid, M., García, C., Hío, J., Martínez, E., & Osorio, J. (2010). Molecular identification and characterization of *Colletotrichum* sp. isolates from Tahiti lime, tamarillo and mango. *Agronomía Colombiana*, 28(3), 391-399.
- Somma, M. (2010). Análisis de la presencia de Organismos Genéticamente Modificados en muestras de alimentos. Extracción y purificación de ADN. JRC European Commission. Disponible en: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/User%20Manual%20ES%20full.pdf>. Consultado el 19 de marzo de 2016.

Detección serológica y molecular del *Potato virus X* (PVX) en tubérculos-semilla de papa (*Solanum tuberosum* L. y *Solanum phureja* Juz. & Bukasov) en Antioquia, Colombia

Serological and molecular detection of *Potato virus X* (PVX) in seed potato tubers (*Solanum tuberosum* L. and *Solanum phureja* Juz. & Bukasov) from Antioquia, Colombia

Daniela García Ruíz^{*}, Manuel Andres Olarte Quintero^{**}, Pablo Gutiérrez Sánchez^{***}, Mauricio Marín Montoya^{****}

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.51389

Resumen

El *Potato virus X* (PVX) es uno de los virus más limitantes del cultivo de la papa en el mundo. Es transmitido solamente por contacto y por tubérculo-semilla. Su control se fundamenta en la siembra de tubérculos certificados por su sanidad viral y en la disponibilidad de metodologías de diagnóstico altamente sensibles. En este trabajo se evaluó la prevalencia del PVX en cuatro diferentes tejidos de tubérculos de *Solanum tuberosum* subsp. andigena var. Diacol-Capiro y *S. phureja* var. Criolla Colombia utilizando pruebas de DAS-ELISA para 128 submuestras y de RT-qPCR para 32 grupos de submuestras (4 submuestras/grupo). Los resultados de las pruebas serológicas indicaron la presencia de PVX en el 6,25 y 50% de las submuestras analizadas para la variedad Diacol-Capiro y Criolla Colombia, respectivamente; mientras que los niveles de prevalencia del PVX utilizando la detección por RT-qPCR fueron del 93,75%, independientemente de la variedad de papa y del tejido evaluado. Los valores promedio del ciclo umbral (Ct) en las RT-qPCR fueron de 25,6 (Ct=18,02 a 34,49) y el análisis de las curvas de desnaturalización permitió identificar dos variantes del virus con valores de Tm de 79,5±1°C y 83,7±1°C. La secuenciación de los amplicones obtenidos por RT-qPCR para los controles positivos y para dos de las muestras, confirmó su naturaleza viral. Estos resultados señalan unos muy altos niveles de prevalencia de PVX en el material de siembra de papa en Antioquia y la necesidad de fortalecer los programas de certificación de semilla con pruebas de detección como RT-qPCR.

Palabras clave: DAS-ELISA, *Potexvirus*, RT-qPCR, Solanaceae.

Abstract

Potato virus X (PVX) is one of the most important virus affecting potato crops worldwide. The virus is only transmitted mechanically and through tuber-seeds. Control of PVX is based on the usage of certified tubers, which in turn depends on the availability of sensitive diagnostic tests that allow its direct detection on seeds. In this work, the prevalence of PVX in four different tuber tissues of *Solanum tuberosum* subsp. andigena var. Diacol-Capiro and *S. phureja* var. Criolla was evaluated using DAS-ELISA (128 subsamples) and RT-qPCR (4 subsamples per group). DAS-ELISA revealed the presence of PVX in 6.25 and 50% of Diacol-Capiro and Criolla Colombia subsamples; in contrast, RT-qPCR detected PVX in 93.75% of the samples independent of the potato variety or type of tissue. Ct values were in the 18.02 to 34.49 range with a mean value of 25.6. Melting curve analysis allowed the identification of two virus variants with Tm values of 79.5±1°C and 83.7±1°C. Sanger

* Ingeniera Biológica. Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Medellín, Colombia. dagarciaaru@unal.edu.co

** Estudiante de Zootecnia. Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Medellín, Colombia. maolarteq@unal.edu.co

*** Biólogo, PhD, Profesor Asociado. Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Medellín, Colombia. paguties@unal.edu.co

**** Ingeniero Agrónomo, MSc., PhD, Profesor Asociado. Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Medellín, Colombia. mamarinm@unal.edu.co

sequencing of the positive controls and two of the samples confirmed RT-qPCR amplicons to be PVX. These results reveal a high level of prevalence of PVX in potato tuber seeds used in Antioquia and the need to strengthen seed certification programs in Colombia through RT-qPCR detection assays.

Key words: DAS-ELISA, *Potexvirus*, RT-qPCR, Solanaceae.

Recibido: noviembre 18 de 2015 **Aprobado:** abril 30 de 2016

Introducción

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L. y *Solanum phureja* Juz. & Bukasov) en Colombia ocupa cerca de 160.000 ha distribuidas en 14 departamentos. Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Nariño son responsables del 85 % de la producción, que asciende a cerca de 2,9 millones de t/año y de la que dependen cerca de 69.000 familias del sector rural del país (DANE, 2013). Las enfermedades virales se constituyen en uno de los problemas fitosanitarios más importantes para este cultivo en Colombia y otros países del mundo; siendo los virus más limitantes el *Potato virus Y* (PVY) (Género *Potyvirus*, Familia *Potyviridae*), *Potato virus S* (PVS) (Género *Carlavirus*, Familia *Betaflexiviridae*), *Potato leafroll virus* (PLRV) (Género *Polerovirus*, Familia *Luteoviridae*), *Potato yellow vein virus* (PYVV) (Género *Crinivirus*, Familia *Closteroviridae*) y *Potato virus X* (PVX) (Género *Potexvirus*, Familia *Alphaflexiviridae*) (Salazar, 2006; Kerlan, 2008).

Los viriones de PVX consisten de varillas flexuosas de 470-580 nm de longitud y 13 nm de diámetro, con un genoma de ARN de cadena sencilla positiva de 6435 nt (Accesión NC_011620), en cuyo extremo 5' se presenta una caperuza de m7G y en el 3' una cola de poli-A. Su genoma consiste de cinco marcos de lectura abiertos (ORFs); el ORF1 codifica para una replicasa viral (RdRp) (*RNA dependent RNA polymerase*), mientras que los ORFs 2 a 4, se presentan traslapados y son denominados como triple bloque de genes (TGB), que codifican para tres proteínas, TGBp1, TGBp2 y TGBp3, involucradas en el movimiento célula a célula del virus; en adición se ha demostrado que TGBp1 también participa como supresor del mecanismo de defensa de las plantas mediado por silenciamiento de ARN (Bayne *et al.*, 2005; King *et al.*, 2011). Finalmente, el ORF5 codifica para la proteína de la cápside viral (CP) de 21 kDa, que además de cumplir funciones estructurales, es un inductor de la respuesta hipersensible en plantas con genes específicos de resistencia a este virus (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007; Kutnjak *et al.*, 2014). El ORF1 es traducido directamente del ARN genómico produciendo la replicasa viral de 165,7 kDa, con sus dominios funcionales de metil-transferasa, unión a nucleótidos, helicasa y RdRp; por su parte, los ORFs 2 a 5 son expresados a partir de ARN subgenómicos (ARNsg) con extremos 3' co-terminales (King *et al.*, 2011).

PVX es uno de los virus más ampliamente distribuidos en los cultivos de papa del mundo y en otras plantas

solanáceas incluyendo el tomate y tabaco; también infecta diversas especies indicadoras de las familias Chenopodiaceae, Amaranthaceae y Fabaceae. Recientemente, se ha reportado la infección natural de PVX en plantas de uchuva (*Physalis peruviana*) en Colombia (Gutiérrez *et al.*, 2015), así como de arveja (*Pisum sativum*) en Irán (Esfandiari *et al.*, 2009) y de la arvense medicinal *Sanicula chinensis* (Apiaceae) en China (Cox y Jones, 2010), lo que es un claro indicativo que el rango de hospedantes de este virus es más amplio de lo que inicialmente se había considerado.

En plantas de papa, PVX causa síntomas suaves que incluyen mosaicos intervenales y amarillamientos tenues en hojas jóvenes; sin embargo en variedades altamente susceptibles puede inducir mosaicos severos, enanismos y pérdidas en los rendimientos del 5 al 20 % (Moriera *et al.*, 1980; Cox y Jones, 2010). Adicionalmente, se ha encontrado que la ocurrencia de infecciones mixtas de PVX con potyvirus como el *Potato virus A* (PVA) y PVY resultan en mayores pérdidas para los cultivos de papa, gracias al sinergismo entre estos virus (Nie y Singh, 2013).

En términos biológicos, el PVX se ha subdividido en cuatro grupos de razas definidas por la respuesta a la inoculación de los aislamientos en cultivares diferenciales de papa conteniendo los genes dominantes de respuesta hipersensible Nb y Nx (Moriera *et al.*, 1980). De esta forma, la raza 1 se caracteriza por no sobrepasar ninguno de estos genes, mientras que las razas 2 y 3 lo hacen para Nx y Nb, respectivamente; y la raza 4 para ambos genes. Adicionalmente, el aislamiento andino HB, sobrepasa Nx y Nb y el gen de resistencia extrema Rx (Cox y Jones, 2010). Análisis filogenéticos basados tanto en la región CP como en el genoma completo de PVX, han demostrado la presencia de dos linajes principales del virus en el mundo: I, también denominado como Euroasiático y II ó Americano; dicha nomenclatura no excluye la ocurrencia de aislamientos de estas regiones en los otros clados, tal como ocurre con el subclado II-1 que siendo denominado como Americano, presenta aislamientos de Inglaterra (Cox y Jones, 2010; Mandal *et al.*, 2012).

En Colombia, la ocurrencia de PVX en papa se reportó inicialmente en infecciones mixtas con PVY, PVS, PLRV y PYVV (Guerrero *et al.*, 1980) y, posteriormente, en la evaluación mediante pruebas de DAS-ELISA de un grupo de 581 accesiones de papa de la Colección Central Colombiana, se encontró en el 13,9 % de las muestras

(Guzmán *et al.*, 2010). Más recientemente, Gil *et al.* (2012) evaluaron la presencia de este virus mediante DAS-ELISA en 320 muestras foliares, representando diez zonas productoras de cuatro Departamentos de Colombia (Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Nariño), y determinaron un índice de detección promedio del 8 %, siendo Nariño la región con mayores niveles de detección (15 %). En este mismo estudio se encontró a partir de la secuenciación de una región de 562 pb de CP, la ocurrencia de aislamientos Colombianos de PVX relacionados filogenéticamente tanto con el linaje Eurasiático (Clado I) como con el Americano (Clado II) y con niveles de variación hasta del 23 % en la región bajo estudio, lo que representa un amplio rango de diversidad genética de este virus en el país.

Ya que el PVX es transmitido por vía mecánica (ej. contacto de plantas, herramientas agrícolas) y por tubérculos-semilla infectados, el desarrollo de metodologías de diagnóstico de este virus que permitan su detección directamente a partir de tejidos de tubérculos, es un aspecto fundamental para el manejo integrado de esta enfermedad. En este estudio se evaluó la prevalencia del PVX en cuatro tipos de tejidos de tubérculos de *S. tuberosum* ssp. andigena var. Diacol-Capiro y *S. phureja* var. Criolla Colombia utilizando pruebas de DAS-ELISA y de PCR cuantitativa con retro-transcripción previa (RT-qPCR). La presencia del PVX en estos tejidos, fue además confirmada mediante secuenciación de algunos de los amplicones obtenidos en las pruebas de RT-qPCR.

Materiales y métodos

Muestras

Esta investigación se realizó con 16 muestras de tubérculos-semilla de *S. tuberosum* subsp. andigena var. Diacol-Capiro y 16 de *S. phureja* var. Criolla Colombia, obtenidas directamente de campos de agricultores y comercializadores de semilla en los municipios de La Unión (Vereda Chuscalito y Cabecera urbana) y Yarumal (corregimiento de Llanos de Cuivá y Cabecera urbana) (Antioquia). Cada uno de los tubérculos se subdividió en cuatro submuestras, correspondientes a porciones de 0,5 a 1 cm² de tejidos de piel, yemas no brotadas, base de brotes y ápice de brotes.

Pruebas de DAS-ELISA

En cada una de las 128 submuestras bajo estudio, se evaluó la presencia de PVX mediante pruebas de DAS-ELISA (*Double-Antibody Sandwich*) de la compañía Agdia (Indiana, EEUU) que utilizan anticuerpos policlonales tanto para la captura como para el conjugado a fosfatasa alcalina utilizado en el revelado. Los resultados colorimétricos fueron cuantificados en un equipo Multiscan (Labsystem, Finlandia), incluyendo en cada prueba dos controles positivos consistentes de una

muestra liofilizada de papa infectada con PVX (Agdia) y una muestra de tejido foliar de *S. phureja* con síntomas de mosaicos tenues obtenida en el municipio de La Unión (Antioquia). Como control negativo de la prueba de DAS-ELISA, se utilizó una muestra liofilizada de tejido de papa libre de virus (Agdia). Los resultados de las pruebas de ELISA fueron analizados a partir del procedimiento estadístico descrito por la compañía serológica Bioreba (Suiza), que utiliza un histograma de distribución de frecuencias, como base para la definición del sitio de corte (*Cut-off*) que diferencia las muestras negativas de aquellas positivas, utilizando la fórmula:

$$\text{Cut - off} = (\text{promedio} + 3 \text{ desviaciones estándar}) \times 1,1. \quad 1)$$

La naturaleza viral del control positivo local de *S. phureja* fue confirmada por RT-PCR convencional y secuenciación Sanger siguiendo el protocolo reportado por Gil *et al.* (2012), con los cebadores PVXF (5'-TAG CAC AAC ACA GGC CAC AG-3') y PVXR (5'-GGC AGC ATT CAT TTC AGC TTC- 3') que se unen a las posiciones del genoma de PVX 5664-5683 y 6225-6205, respectivamente, y amplifican un producto de 562 pb de la región CP (Nie y Singh, 2001).

Pruebas de RT-qPCR

Para la detección de PVX utilizando RT-qPCR se utilizaron grupos (*bulks*) de cuatro submuestras correspondientes a cada tipo de tejido de los tubérculos procedentes de cada localidad bajo estudio, para un total de 32 muestras bajo análisis (tabla 1). El ARN total se extrajo utilizando el kit GeneJET Plant RNA Purification (Thermo Fisher Scientific, EEUU), a partir de 100 mg del tejido macerado, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN así obtenido fue eluido en 50 µL de agua tratada con DEPC y determinada su concentración y pureza por lecturas de absorbancia a 260 nm y 280 nm en un equipo Nanodrop 2000C (Thermo Fisher Scientific).

Las reacciones de RT-qPCR se realizaron en dos pasos utilizando el sistema SYBR Green I y los cebadores PVX_101-2_FP: 5' AAG CCT GAG CAC AAA TTC GC 3' y PVX_101-2 RP: (5' GCT TCA GAC GGT GGC CG 3') que generan un amplicon de 101 pb correspondiente a la región de CP ubicada entre las posiciones 6110 y 6211 del genoma de referencia de la accesión del GenBank M38480 (Agindotan *et al.*, 2007). La transcripción reversa se realizó en 20 µL con 200 U de la enzima Maxima Transcriptasa reversa (Thermo Fisher Scientific), 1X de buffer RT, 0,5 mM de dNTPs, 20 pmol del cebador reverso PVXR, 20 U de inhibidor de ribonucleasas (ARNasas) (RiboLock, Thermo Fisher Scientific) y 4 µL del ARN total. Las reacciones se incubaron en un termociclador T3 (Biometra, Alemania) a 65 °C por 5 min, seguido de 50 °C por 30 min y 85 °C por 5 min para desnaturar la enzima. Las reacciones de

Tabla 1. Detección por RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) del *Potato virus X* (PVX) en tubérculos-semilla de papa procedentes de diferentes localidades en Antioquia.

Muestra	Localidad de procedencia	Variedad	Tejido de tubérculo	Valor de Ct*	Valor de Tm**
C-				>35**	
C+ (Agdia)				20,49	83,7
<u>C+ (<i>S. phureja</i>)</u>				20,06	83,7
<u>C+ (<i>P. peruviana</i>)</u>				26,8	80,6
1	La Unión-Cabecera	Diacol-Capiro	Piel	22,83	81,0
2	La Unión-Cabecera	Diacol-Capiro	Yemas	>35	
3	La Unión-Cabecera	Diacol-Capiro	Base de Brotes	25,99	80,7
4	La Unión-Cabecera	Diacol-Capiro	Ápice Brotes	23,24	80,5
5	La Unión-Chuscalito	Diacol-Capiro	Piel	25,33	80,5
6	La Unión-Chuscalito	Diacol-Capiro	Yemas	25,02	80,5
7	La Unión-Chuscalito	Diacol-Capiro	Base de Brotes	25,65	80,3
8	La Unión-Chuscalito	Diacol-Capiro	Ápice Brotes	24,68	80,7
9	Yarumal-Cabecera	Diacol-Capiro	Piel	25,67	80,5
10	Yarumal-Cabecera	Diacol-Capiro	Yemas	25,44	80,5
11	Yarumal-Cabecera	Diacol-Capiro	Base de Brotes	25,26	80,5
12	Yarumal-Cabecera	Diacol-Capiro	Ápice Brotes	24,26	80,3
13	Yarumal-Llanos Cuivá	Diacol-Capiro	Piel	28,02	85,3
14	Yarumal-Llanos Cuivá	Diacol-Capiro	Yemas	27,39	85,0
15	Yarumal-Llanos Cuivá	Diacol-Capiro	Base de Brotes	24,88	85,2
16	Yarumal-Llanos Cuivá	Diacol-Capiro	Ápice Brotes	22,09	85
17	Yarumal-Cabecera	Criolla Colombia	Piel	32,78	79,8
18	Yarumal-Cabecera	Criolla Colombia	Yemas	31,68	79,5
19	Yarumal-Cabecera	Criolla Colombia	Base de Brotes	>35	
20	Yarumal-Cabecera	Criolla Colombia	Ápice Brotes	25,20	82
21	Yarumal-Llanos Cuivá	Criolla Colombia	Piel	34,49	78,2
22	Yarumal-Llanos Cuivá	Criolla Colombia	Yemas	32,65	78,7
23	Yarumal-Llanos Cuivá	Criolla Colombia	Base de Brotes	28,81	80,3
24	Yarumal-Llanos Cuivá	Criolla Colombia	Ápice Brotes	25,3	80,5
25	Yarumal-Cabecera	Criolla Colombia	Piel	24,24	84,5
26	Yarumal-Cabecera	Criolla Colombia	Yemas	23,68	84,3
27	Yarumal-Cabecera	Criolla Colombia	Base de Brotes	21,76	84,2
28	Yarumal-Cabecera	Criolla Colombia	Ápice Brotes	18,02	84,5
29	Yarumal-Llanos Cuivá	Criolla Colombia	Piel	24,89	84,5
30	Yarumal-Llanos Cuivá	Criolla Colombia	Yemas	27,36	84,5
31	Yarumal-Llanos Cuivá	Criolla Colombia	Base de Brotes	23,32	84,5
32	Yarumal-Llanos Cuivá	Criolla Colombia	Ápice Brotes	18,65	84,7

* Ct corresponde al ciclo umbral de amplificación; Ct>35 representa resultados negativos en las pruebas de RT-qPCR.

** Tm indica la temperatura de fusión, es decir aquella en la que el 50% de la doble hélice de los amplicones se encuentran desnaturalizados. Las muestras subrayadas corresponden a los amplicones obtenidos por RT-qPCR que fueron secuenciados y confirmados como parte de la región que codifica para la cápside de PVX.

qPCR se realizaron en 25 μ L conteniendo 12,5 μ L del kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific), 10 μ L de agua estéril tratada con DEPC, 0,3 μ M de los cebadores PVX_101-2_FP y PVX_101-2_RP y 50-100 ng de ADN copia (ADNc). La amplificación se adelantó en un equipo Rotor-Gene Q-5plex Platform (Qiagen) y consistió de 95 °C por 10 min para activar la Taq-polimerasa (*Hot-start*), seguido por 35 ciclos de 95 °C por 10 s y 50 °C por 45 s. La adquisición de fluorescencia se realizó después de cada ciclo de amplificación y los valores de ciclo umbral (Ct) para cada muestra fueron definidos utilizando los valores por defecto del programa Rotor-Gene Q ver. 1.7., siendo consideradas como positivas aquellas muestras que superaron el Ct antes del ciclo 35 (Schna *et al.*, 2004). Posteriormente, los amplicones fueron sometidos a un análisis de desnaturalización utilizando la herramienta del equipo HRM (*High Resolution Melting*) entre 50 y 99 °C y comparados los valores de Tm (*melting temperature*) con respecto a los alcanzados para los controles positivos de *S. tuberosum* (Agdia), *S. phureja* y *S. peruviana*, infectados con PVX; este último corresponde a la muestra utilizada por Gutiérrez *et al.* (2015) para obtener el primer reporte del genoma completo de este virus en Colombia. Todas las reacciones incluyeron además una muestra blanco (libre de ADN copia).

Finalmente, cinco de los amplicones correspondientes a dos muestras de tejido de tubérculo, al PVX de *S. peruviana* y a los dos controles positivos, fueron secuenciados por el método de Sanger, previa purificación con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Las secuencias fueron editadas con el software Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) y comparadas con GenBank mediante BLASTN (Altschul *et al.*, 1990).

Resultados y discusión

Pruebas de DAS-ELISA

El PVX fue detectado utilizando las pruebas de DAS-ELISA con anticuerpos policlonales, en el 6,24 % y 50 % de las submuestras de tubérculos de la variedad Diacol-Capiro y Criolla Colombia, respectivamente; en la primera variedad, PVX sólo fue encontrado en tejidos de brotes (base y ápices), mientras que en Criolla-Colombia fue encontrado en los cuatro tipos de tejidos evaluados (figura 1). La validez de la prueba de DAS-ELISA fue confirmada por que se obtuvieron valores esperados tanto para los controles positivos (2,77 para Agdia y 2,88 para *S. phureja* foliar) como para los controles negativos (promedio=0,115; SD=0,025); definiéndose en el histograma de frecuencias de absorbancias a 405 nm el nivel de 0,173, como el valor de corte del ensayo. La naturaleza viral del control positivo de *S. phureja* utilizado en el estudio, fue confirmada por secuenciación Sanger del amplicon de 562 pb, que presentó niveles de identidad del 99 % con

respecto a diferentes accesiones de CP de PVX (Ej. X65015, HG518657 y HQ433257, valor $e=0,0$). La accesión HQ433257 corresponde a la región CP de un aislamiento reportado por Gil *et al.* (2012) del municipio de la Ceja del Tambo (Antioquia).

Las diferencias evidentes encontradas entre los niveles de prevalencia de PVX detectados mediante pruebas de DAS-ELISA en los dos materiales de papa evaluados, deben registrarse con cautela, dados los niveles moderados de sensibilidad de esta prueba y los bajos rangos de título que alcanzan los virus en tejidos tubérculos en dormancia (Mumford *et al.*, 2000; Agindotan *et al.*, 2007; Fageria *et al.*, 2013). Por esta razón, también se evaluó la infección del PVX utilizando pruebas de RT-qPCR a partir de ARN total extraído de *bulks* de tejidos constituidos a partir de las mismas submuestras utilizadas en las pruebas de DAS-ELISA. Reportes de literatura de detección de virus en papa, dan cuenta de grandes diferencias entre los niveles de sensibilidad alcanzados en dichas pruebas. Así por ejemplo, Mumford *et al.* (2000), registran que el uso de RT-qPCR para detectar el *Potato mop-top virus* (PMTV) ofrecía niveles de detección superiores en 10^4 veces a los obtenidos con pruebas convencionales de ELISA; mientras que Kogovsek *et al.* (2008), en un estudio tendiente a diseñar pruebas de RT-qPCR para diferenciar aislamientos recombinantes de PVY^{NTN}, encontraron que las pruebas en tiempo real presentaban niveles de sensibilidad superiores entre 10^5 y 10^7 veces, con respecto a las pruebas de ELISA tradicionalmente empleadas para detectar este virus.

Pruebas de RT-qPCR

Utilizando pruebas de RT-qPCR con el sistema SYBR Green I y cebadores específicos que amplifican un segmento de 101 pb de la región CP, fue posible detectar el PVX en 30 de las 32 (93,75 %) muestras evaluadas de ambas variedades de papa, independientemente del tipo de tejido utilizado y de la localidad de procedencia de los tubérculos. Los valores de ciclo umbral (Ct) encontrados para las muestras se presentaron en el rango de 18,02 a 34,49, con un promedio de 25,6, mientras que dichos valores fueron de 20,49, 20,06 y 26,8 para los controles positivos de *S. tuberosum* (Agdia), *S. phureja* y *P. peruviana*, respectivamente (tabla 1). El análisis de las curvas de desnaturalización, permitió identificar dos grupos de valores de Tm entre las muestras analizadas: Tm₁=79,5 \pm 1 °C y Tm₂=83,7 \pm 1 °C, lo que representa la ocurrencia de al menos dos variantes de este virus en los cultivos de papa de Antioquia. El amplicon generado para el control positivo de *P. peruviana* presentó el Tm₁ (80,6 °C), mientras que aquellos de *S. tuberosum* y *S. phureja* correspondían al Tm₂ (83,7 °C) (figura 2). Trabajos moleculares previos, realizados por Gil *et al.* (2012) a partir de análisis de secuencias de la cápside viral de aislamientos de PVX procedentes de tejido foliar de papa de diferen-

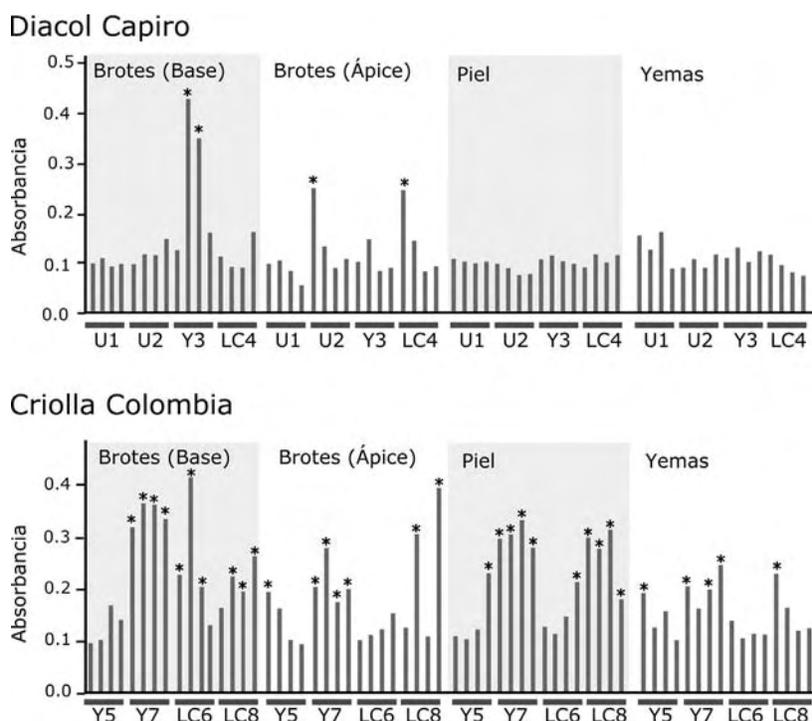


Figura 1. Resultados de las pruebas de DAS-ELISA para la detección de *Potato virus X* (PVX) en diferentes tejidos de tubérculos de papa variedades Diacol-Capiro y Criolla Colombia, obtenidos en el Departamento de Antioquia (Colombia). Los asteriscos (*) representan los resultados positivos, utilizando como valor de corte del ensayo una absorbancia de 0,173. Los nombres en el eje X representan los sitios de muestreo. Y3, 5, 7: Yarumal-Cabecera; LC4, 6, 8: Yarumal-Llanos de Cuivá; U1: La Unión-Cabecera; U2: La Unión-Chuscalito.

tes departamentos del país, demostraron la ocurrencia de cepas asociadas filogenéticamente a los dos linajes de este virus reportados en el mundo (I: Eurasiático y II: Americano). Además, los análisis de identidad utilizando las secuencias de CP indicaban la presencia de niveles de disimilaridad de hasta el 23 % entre cepas colombianas de PVX, lo que señalaba un alto nivel de variación de esta especie viral en el país.

La naturaleza viral de los amplicones obtenidos en las reacciones de RT-qPCR fue confirmada por secuenciación Sanger, encontrándose un 100 % de identidad entre las secuencias de los controles positivos de *S. tuberosum* y *S. phureja*, y de dos de las muestras de tubérculos, con respecto a secuencias de aislamientos del clado de Eurasia de PVX (ej. KF568900 y GU144348, valor $e=4 \times 10^{-19}$). Por su parte, la secuencia del control positivo de *P. peruviana* presentó alta identidad con la accesión correspondiente al genoma completo de PVX (KM659859, valor $e=2 \times 10^{-15}$) reportada por Gutiérrez *et al.* (2015).

Los altos niveles de infección de PVX detectados en este trabajo a partir de tubérculos de las variedades Diacol-Capiro y Criolla Colombia no resultan sorprendentes, por cuanto trabajos previos realizados en Colombia utilizando técnicas menos sensibles que la RT-qPCR como ELISA (Guzmán *et al.*, 2010; Gil *et al.*, 2012) e inmu-

noimpresión (Franco-Lara *et al.*, 2009) habían señalado la prevalencia de este virus en tejido foliar de diferentes variedades de papa en niveles de entre 8 y 20 %; mientras que en trabajos adelantados en otros países en desarrollo como China (Wang *et al.*, 2011), Pakistán (Abbas *et al.*, 2012) y Camerún (Njukeng *et al.*, 2013), los niveles reportados de infección por PVX alcanzan valores de 12,4 % (en tejido foliar), 53,6 % (en tejido foliar) y 90 % (en tubérculos), respectivamente. Estos hallazgos de infección de PVX, son un indicador de los problemas que se tienen en Colombia y en otros países con respecto a los programas de manejo integrado de enfermedades virales y de certificación por su sanidad viral de los tubérculos-semilla de papa, pues se ha demostrado que virus como el PVX que no son transmitidos por áfidos u otros artrópodos, pueden ser efectivamente controlados a partir de la utilización de material de siembra libre de virus y prácticas culturales genéricas (ej. desinfección de herramientas, restricción a ingreso de lotes, etc.) (Halterman *et al.*, 2012; Frost *et al.*, 2013). Así por ejemplo, en países como EEUU y Canadá, los niveles de detección de este virus en los cultivos de papa son marginales, siendo reportado que aún en grandes regiones cultivadoras como Wisconsin (EEUU), de 500.000 plantas evaluadas en el programa de certificación de semilla entre los años 1990 a 2000, ninguna resultó positiva para la infección de PVX; así

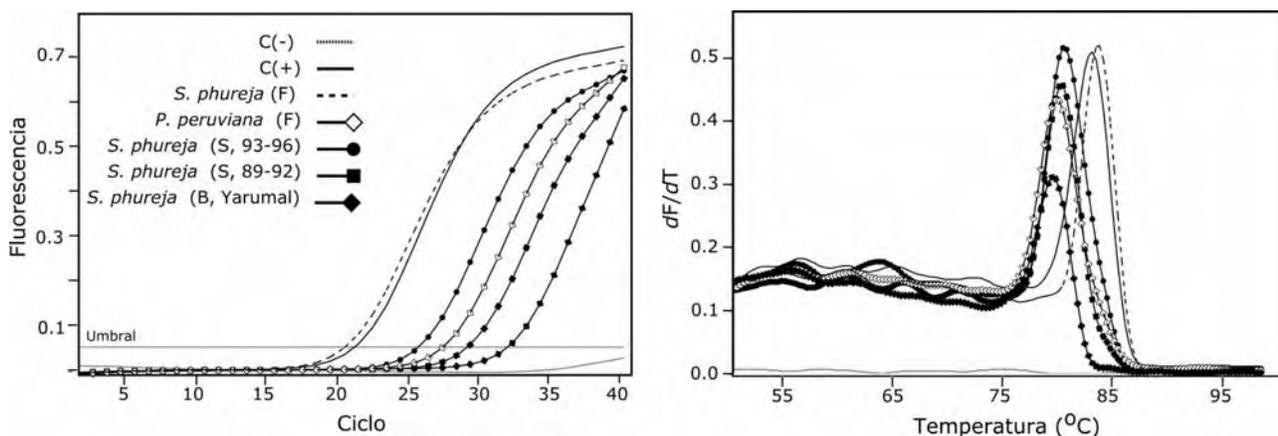


Figura 2. (A) Curvas de amplificación por RT-qPCR utilizando el sistema SYBR Green I y los cebadores PVX_101-2_FP y PVX_101-2 RP para la detección del *Potato virus X* (PVX) en tejidos de tubérculos de papa obtenidos en el Departamento de Antioquia (Colombia). (B) Perfiles de las curvas de desnaturalización de amplicones específicos de PVX obtenidos por RT-qPCR, mostrando los dos grupos de valores de T_m ($T_{m1}=79,5\pm 1^\circ\text{C}$ y $T_{m2}=83,7\pm 1^\circ\text{C}$) que identifican dos variantes de este virus en Antioquia.

como tampoco se detectó este virus en evaluaciones realizadas en 2010 a partir de 2100 plantas procedentes de 20 lotes cultivados con nueve variedades de papa en este estado (Frost *et al.*, 2013).

Como se puede inferir de los resultados obtenidos en este estudio, los niveles de prevalencia de PVX en tubérculos-semilla de las variedades Diacol-Capiro y Criolla-Colombia procedentes de diferentes localidades de Antioquia, son muy altos, por lo que es imperativo el fortalecimiento de los programas de certificación de semilla de papa en el país y la utilización de metodologías de detección de virus altamente sensibles, como la RT-qPCR aquí evaluada, para de esta forma garantizar la sanidad de los materiales de plantas madre *in vitro*, Super-Elite y Elite, utilizados como material para la obtención de la semilla básica, registrada y certificada de papa que es comercializada en el país.

Conclusiones

Utilizando pruebas de DAS-ELISA y RT-qPCR, en este trabajo se detectaron altos niveles de prevalencia del PVX en diferentes tejidos de tubérculos-semilla de papa de las variedades Diacol-Capiro y Criolla Colombia, por lo que es necesario el fortalecimiento de los programas de certificación de semilla de papa en Colombia y facilitar el acceso a dicho material por parte de los pequeños agricultores de este tubérculo en el país.

La técnica de RT-qPCR utilizando el sistema SYBR Green I y los cebadores específicos PVX_101-2_FP y PVX_101-2 RP, permitió la detección del PVX en los cuatro diferentes tejidos de tubérculos de papa evaluados (piel, yemas no brotadas, base de brotes y ápice de brotes); presentándose amplificaciones positivas en valores de ciclo umbral (Ct) tan bajos como 18,02 y

con un promedio de 25,6, lo que implica la ocurrencia de altos niveles de título viral en dichos tejidos. Con el uso de la herramienta de análisis de curvas de desnaturalización acoplada a esta prueba, se determinó la ocurrencia de al menos dos variantes de este virus en Colombia, diferenciados por valores de T_m de $79,5\pm 1^\circ\text{C}$ y $83,7\pm 1^\circ\text{C}$.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia a través del proyecto 19438 de la Convocatoria: Nuevos proyectos de investigación, creación o innovación (Modalidad 2).

Referencias bibliográficas

- Abbas, M. F., Hameed, S., Rauf, A., Nosheen, Q., Ghani, A., Qadir, A., & Zakia, S. (2012). Incidence of six viruses in potato growing areas of Pakistan. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 24(1), 44-47.
- Agindotan, B. O., Shiel, P. J., & Berger, P. H. (2007). Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 142(1-2), 1-9.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
- Bayne E. H., Rakitina, D. V., Morozov, S. Y., & Baulcombe, D. C. (2005). Cell-to-cell movement of potato potyvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *The Plant Journal*, 44(3), 471-482.
- Cox A., & Jones, R. (2010). Genetic variability in the coat protein gene of *Potato virus X* and the current relationship between phylogenetic placement and resistance groupings. *Archives of Virology*, 155(8), 1349-1356.
- DANE. (2013). Encuesta Nacional Agropecuaria-ENA. En: Departamento Nacional de Estadística, <http://www.dane.gov.co>. Consultado en: mayo 2015.
- Esfandiari, N., Kohi-Habibi, M., Hohn, T., & Pooggin, M. M. (2009). Complete genome sequence of an Iranian isolate of *Potato vi-*

- rus X from the legume plant *Pisum sativum*. *Virus Genes*, 39(1), 141-145.
- Fageria, M. S., Singh, M., Nanayakkara, U., Pelletier, Y., Nie, X., & Wattie, D. (2013). Monitoring current-season spread of *Potato virus Y* in potato fields using ELISA and real-time RT-PCR. *Plant Disease*, 97(5), 641-644.
- Franco-Lara, L., Soto, C. A., & Guzmán, M. (2009). Detección de los virus PVX, PVS, PVY y PLRV en la Colección Central Colombiana de papa por medio de la técnica de inmunopresión (IMI). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 5(1), 130-139.
- Frost, K., Groves, R. L., & Charkowski, A. O. (2013). Integrated control of potato pathogens through seed potato certification and provision of clean seed potatoes. *Plant Disease*, 97(10), 1268-1280.
- Gil J. F., Cotes, J. M., & Marín, M. (2012). Detección y caracterización molecular del Virus X de la Papa (PVX) en regiones productoras de papa de Colombia. *Revista de Protección Vegetal*, 27(2), 69-76.
- Guerrero, O., & Martínez, G. (1980). Evaluación de pérdidas ocasionadas en la variedad de papa Puracé por los virus *Potato virus X*, *Potato virus Y* y *Potato leafroll virus*. *Fitopatología Colombiana*, 9(1), 3-40.
- Gutiérrez, P. A., Alzate, J. F., & Marín, M. (2015). Complete genome sequence of an isolate of *Potato virus X* (PVX) infecting Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) in Colombia. *Virus Genes*, 50(3), 518-522.
- Guzmán, M., Román, V., Franco, L., & Rodríguez, P. (2010). Presencia de cuatro virus en algunas accesiones de la Colección Central Colombiana de papa mantenida en campo. *Agronomía Colombiana*, 28(2), 225-233.
- Halterman, D., Charkowski, A., & Verchot, J. (2012). Potato, viruses, and seed certification in the USA to provide healthy propagated tubers. *Pest Technology*, 6(1), 1-14.
- Kerlan, C. (2008). Potato viruses. pp. 458-471. En: Mahy, B. W. y M. H. van Regenmortel (eds.). *Desk encyclopedia of plant and fungal virology*. Oxford, Reino Unido: Academic Press, p 632.
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. (2011). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, p 1327.
- Kogovsek P., Gow, L., Pompe-Novak, M., Gruden, K., Foster, G. D., Boonham, N., & Ravnikar, M. (2008). Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of *Potato virus Y* isolates. *Journal of Virological Methods*, 149(1), 1-11.
- Kutnjak D., Silvestre, R., Cuellar, W., Pérez, W., Müller, G., Ravnikar, M., & Kreuze, J. (2014). Complete genome sequences of new divergent potato virus X isolates and discrimination between strains in a mixed infection using small RNAs sequencing approach. *Virus Research*, 191(1), 45-50.
- Mandal, B., Kumar, A., Rani, P., & Kumar, R. (2012). Complete genome sequence, phylogenetic relationships and molecular diagnosis of an Indian isolate of *Potato virus X*. *Journal of Phytopathology*, 160(1), 1-5.
- Moriera, A., Jones, R. A. C., y Fribourg, C. E. (1980). Properties of a resistance-breaking strain of potato virus X. *Annals of Applied Biology*, 95(1), 93-103.
- Mumford, R. A., Walsh, K., Barker, I., & Boonham, N. (2000). Detection of *Potato mop top virus* and *Tobacco rattle virus* using a multiplex real-time fluorescent reverse transcription polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, 90(5), 448-453.
- Nie X., & Singh, R. P. (2001). A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. *Journal of Virological Methods*, 91(1), 37-49.
- Nie X., & Singh, M. (2013). Response of potato, tobacco and *Physalis floridana* plants to mixed infection with PVX, PVYNTN and PVY° strains. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35(3): 390-401.
- Njukeng, P. A., Chewachong, G. M., Sakwe, P., Chofong, G., Nkeabeng, L. W., Demo, P., & Njualet, K. D. (2013). Prevalence of six viruses in potato seed tubers produced in informal seed system in the North West region of Cameroon. *Cameroon Journal of Experimental Biology*, 9(1), 44-49.
- Salazar, L. F. (2006). Emerging and re-emerging potato diseases in the Andes. *Potato Research*, 49(1), 43-47.
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A., & Gallitelli, D. (2004). Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 110(9), 893-908.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipki, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Verchot-Lubicz, J., Ye, C. M., & Bamunusinghe, D. (2007). Molecular biology of potexviruses: recent advances. *Journal of General Virology*, 88(6), 1643-1655.
- Wang, B., Ma, Y., Zhang, Z., Wu, Z., Wu, Y., Wang, Q., y Li, M. 2011. Potato viruses in China. *Crop Protection*, 30(9), 1117-1123.

Efecto de la cisteína en un proceso de biodesulfurización de carbones en lecho empacado

Effect of cysteine in a biodesulfurization process of packed-bed coals

Gerardo Andrés Caicedo Pineda*, Marco Antonio Márquez Godoy**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.50471

Resumen

Se llevaron a cabo procesos de biodesulfurización de dos carbones colombianos ricos en azufre ("Mina Vieja" y "Vampiro"), en reactores de lecho empacado a nivel de erlenmeyer, utilizando un consorcio de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ATCC 23270) y *Acidithiobacillus thiooxidans* (ATCC 15494), evaluando la adición de cisteína a la solución lixiviante. Los ensayos fueron monitoreados por medidas de hierro en solución, pH y potencial redox. Adicionalmente, se hicieron análisis mineralógicos por difracción de rayos X (DRX) antes y después de los experimentos. Los ensayos sin adición de cisteína alcanzaron una oxidación de pirita de 45.3% y 57.9% para "Mina Vieja" y "Vampiro" respectivamente. Cuando se adicionó cisteína, la oxidación aumentó en 14.9% para "Mina Vieja" y 6.4% para "Vampiro". Por otra parte, todos los ensayos evidenciaron remoción de caolinita, debido a su interacción con el ácido sulfúrico del medio. Con base en los resultados obtenidos, los componentes del carbón influenciaron tanto crecimiento bacteriano como la eficiencia de la cisteína sobre el grado de pirita oxidada.

Palabras clave: biodesulfurización de carbón; reactor de lecho empacado; cisteína; *Acidithiobacillus ferrooxidans*; *Acidithiobacillus thiooxidans*.

Abstract

Biodesulphurization processes of a two sulphur-rich coals from Colombia ("Mina Vieja" y "Vampiro") were carried out at packed-bed reactors at erlenmeyer level, using a consortium of *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ATCC 23270) and *Acidithiobacillus thiooxidans* (ATCC 15494). Cysteine addition were evaluated. The assays were monitored by measurements of iron content, pH, and redox potential. X-ray diffraction (XRD) were used to establish the mineralogy before and after the process. The assays without cysteine respectively reached a pyrite oxidation of 45.3% ("Mina Vieja") and 57.9% ("Vampiro") after 38 days. Cysteine addition improved pyrite oxidation by 14.9% ("Mina Vieja") and 6.4% ("Vampiro"). On the other hand, all the assays removed kaolinite by interaction with sulphuric acid of the media. In base to the results, coal compounds influence bacterial growth and affects the efficiency of cysteine over pyrite oxidation.

Key words: coal biodesulphurization; packed-bed reactor; cysteine; *Acidithiobacillus ferrooxidans*; *Acidithiobacillus thiooxidans*.

Recibido: septiembre 6 de 2015

Aprobado: mayo 2 de 2016

Introducción

Los procesos de remoción de azufre mediados por microorganismos se consideran una alternativa económica y ambientalmente viable que puede competir con los procesos físicos y químicos convencionales. En los

últimos años, se han evaluado diferentes configuraciones de procesos, al fin de diseñar un sistema que pueda ser aplicado a nivel comercial (Caicedo *et al.*, 2012; Cara *et al.*, 2006). Se ha estimado que los sistemas de lixiviación en lecho empacado, reducen hasta un 70%

* Ph.D Ingeniería – Ciencia y Tecnología de los Materiales, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Calle 10A # 43D-96, gacaiced@unal.edu.co

** Ph.D Mineralogía, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Carrera 80 No. 65-223 - Núcleo Robledo, mmarquez@unal.edu.co

los costos de operación, puesto que, al no necesitar agitación mecánica, los costos energéticos son bajos (Cara *et al.*, 2001). Sin embargo, su industrialización aún no ha sido perfeccionada, debido a que se requieren tiempos de residencia largos para obtener remociones de pirita considerables, lo cual no es rentable económicamente con base en la demanda y precio del carbón (Rossi, 2013). No obstante, el proceso podría llegar a ser factible si se disminuyen aún más los costos de operación.

Con el fin de equilibrar la razón costo/beneficio del proceso, se han propuesto estrategias de lavados intermitentes, donde se han obtenido remociones alrededor del 50% después de 45 días, irrigando el material cada cierto número de días (Cara *et al.*, 2006, 2001). Sin embargo, la velocidad de oxidación de pirita sigue siendo un factor clave. Basados en estudios que proponen el uso de aditivos potenciadores de la velocidad de oxidación de pirita, se ha reportado que *Acidithiobacillus ferrooxidans* incrementa notablemente la oxidación de pirita en presencia de aminoácidos o proteínas que contienen el grupo sulfhidrilo en su estructura (-SH), especialmente cisteína, ya que este compuesto se comporta como un agente corrosivo y además facilita el transporte químico de energía entre la pirita y los microorganismos (Liu *et al.*, 2006; Rojas-Chapana & Tributsch, 2000). No obstante, esto sólo fue probado en pirita pura y no se consideró el efecto de otros minerales o compuestos que naturalmente se encuentran en el carbón.

En este trabajo se describe el efecto de la adición de cisteína en un proceso de biodesulfurización en lecho empacado, con el fin de obtener una base que permita desarrollar una alternativa con una mejor velocidad de

disminución de azufre. Para ello, se utilizaron análisis químicos y mineralógicos, a fin de explicar los fenómenos encontrados en todos los procesos.

Materiales y métodos

Carbón

Se recolectaron dos muestras de carbón de los mantos "Mina Vieja" y "Vampiro" de la Mina "La Angostura" (Municipio de Morales, Cauca, Colombia). Después de un proceso de cuarteo, las muestras se molieron a un tamaño de partícula entre pasante malla 8 (2.38 mm) y retenido malla 30 (0.50 mm), de acuerdo con la serie Tyler de tamices (-8 +30 #Ty). La tabla 1 muestra los análisis próximos, formas de azufre, composición de hierro de los materiales a tratar.

Microorganismos

Se seleccionó un consorcio conformado por *A. thiooxidans* ATCC 15494 y *A. ferrooxidans* ATCC 23270. El cultivo tuvo una adaptación previa a cada muestra de carbón y a cisteína (hasta una concentración de 60 mg/L), con base en protocolos de investigaciones previas en carbones colombianos (Caicedo *et al.*, 2011; Cardona & Márquez, 2009). Cada inóculo se preparó en erlenmeyers de 350 mL, con un volumen de trabajo de 150 mL y una relación de 1 g de carbón por cada 10 mL de solución lixivante, compuesta por 10% v de inóculo bacteriano (5×10^8 células/mL), 150 mg Fe²⁺/L (a partir de FeSO₄·7H₂O), 1.5 mL H₂SO₄ (98% v)/L, y solución base el medio T&K (500 mg (NH₄)₂SO₄/L, 500 mg MgSO₄·7H₂O/L y 500 mg KH₂PO₄/L) (Tuovinen & Kelly, 1973). Los cultivos se incubaron en un agitador

Tabla 1. Análisis próximos, formas de azufre, composición de hierro y composición mineralógica en las muestras de carbón.

Análisis próximos	"Mina Vieja"	"Vampiro"	Método
Humedad residual (%)	4.6	2.6	ASTM D 3173
Cenizas (%)	27.0	16.5	ASTM D 3174
Materia volátil (%)	34.7	38.1	ISO 562
Carbono fijo (%)	33.7	42.8	ASTM D 3172
Capacidad calorífica (Cal/g)	5106	6341	ASTM D 5865
Formas de azufre (%)			
Pirítico	4.00	2.67	ASTM D 2492-02
Sulfatos	0.79	1.90	ASTM D 2492-02
Orgánico	1.48	1.43	ASTM D 4239
Composición de hierro (%)			
Pirítico	3.50	2.34	ASTM D 2492-02
No Pirítico	0.65	1.63	ASTM D 2492-02

orbital, por 12 días, a una temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y una velocidad de agitación de $180 \text{ rpm} \pm 2 \text{ rpm}$.

Proceso de biodepiritización

Se prepararon biorreactores de columna (diámetro: 3.8 cm, alto: 25 cm), con sus respectivos tanques para lixiviado (volumen: 100 mL). Cada columna fue llena con 200 g de carbón. Todos los ensayos tuvieron 4 etapas de proceso, basadas en un protocolo establecido por otros autores (Cara *et al.*, 2001):

- **Acidificación:** el carbón en la columna fue lavado con una solución de H_2SO_4 ($\text{pH}=1.6$) hasta que la diferencia entre el pH de entrada y de salida no fuera superior a 0.2. Después esta solución fue analizada y descartada.
- **Preparación de inóculo:** paralelo a la etapa de acidificación, se prepararon 100 mL de cultivo bacteriano, el cual contuvo 10% de inóculo preparado en la sección anterior, 1250 mg/L de Fe^{2+} (a partir de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 1.5 mL/L de H_2SO_4 al 98% y solución base del medio T&K, utilizada en la preparación de los microorganismos. El cultivo se dejó en un agitador orbital, con una velocidad de agitación de $180 \text{ rpm} \pm 2 \text{ rpm}$, hasta no observar cambios significativos en el potencial de óxido-reducción (Eh).
- **Biodepiritización:** se alimentó el inóculo por la parte superior de la columna a una razón de $3.7 \text{ mL/min} \pm 0.3 \text{ mL/min}$ (irrigación). Posteriormente, se recolectó en el tanque de lixiviado y se llevó a un agitador orbital ($180 \text{ rpm} \pm 2 \text{ rpm}$). Este proceso se repitió cada dos días, por 38 días. Al segundo día y cada cuatro días, la mitad del lixiviado fue reempla-

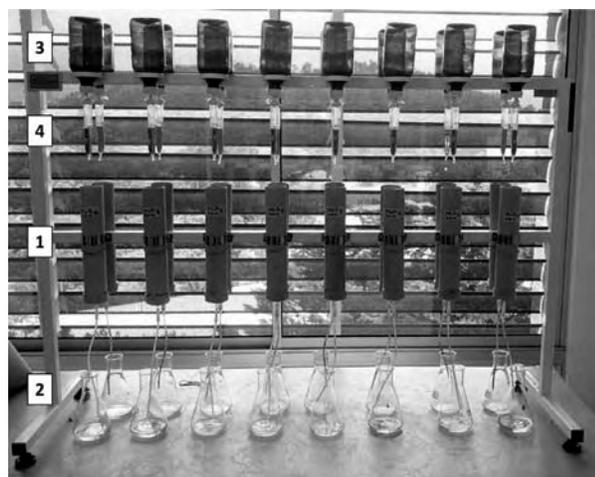


Figura 1. Biorreactores de columna a nivel de laboratorio. Cada biorreactor consta de la columna donde va el carbón (1), erlenmeyer donde se preparó el inóculo/tanque de lixiviado (2), tanque de alimentación de lixiviado (3) y válvula reguladora de flujo (4).

zada por agua destilada. Al día veintidós, todo el lixiviado fue sustituido por agua destilada. Después, el proceso continuo, usando el mismo protocolo que los primeros veinte días.

- **Lavado:** al final de los procesos de biodepiritización, el carbón fue lavado con agua destilada, para eliminar gran parte del hierro remanente de la oxidación de pirita.

La figura 1 muestra el montaje de los biorreactores de columna. Para cada muestra de carbón, se evaluaron dos procesos por duplicado: (i) sin adición de cisteína y (ii) con adición de 100 mL de una solución de 60 mg Cys/L, previa a la etapa de biodepiritización, más 0.3 mg Cys cuando se reemplazaba parte del lixiviado por agua destilada. Todas las etapas fueron trabajadas a temperatura ambiente.

Durante la etapa de biodepiritización se hicieron mediciones de pH y potencial redox (Eh) a los lixiviados antes y después de cada irrigación, mediante el uso de un equipo SCHOTT HandyLab, con un electrodo de Eh de Ag/AgCl y un electrodo de pH con electrolito de KCl. El hierro total de todo el proceso fue determinado en un espectrofotómetro Thermo GENESYS UV 10, utilizando el método de la o-fenantrolina ASTM E 394-09. Al final de cada ensayo, se midieron el azufre pirítico y el azufre en forma de sulfatos al carbón tratado, con base en el método ASTM D 2492-02. Adicionalmente, se estableció la composición mineralógica de las muestras tratadas mediante difracción de rayos X (DRX). La muestra de carbón se molió en mortero de ágata hasta -200 #Ty y se analizó en un difractorómetro marca Rigaku Miniflex II, mediante el método paso a paso, en el intervalo 2θ entre 5° y 70° , tamaño del paso de 0.01° , con un tiempo de conteo de 1 segundo. Los minerales presentes en el carbón fueron cuantificados mediante refinamiento de Rietveld, cuyas simulaciones y cálculos se llevaron a cabo en el programa X'Pert HighScore Plus© y la base de datos PDF2.

Resultados

Durante la etapa de preparación del inóculo, los microorganismos mantuvieron valores de pH y Eh máximos de 1.75 y 645 mV respectivamente, después de 5 días en el agitador orbital. Sin embargo, estos parámetros cayeron, hasta 1.35 y 470 mV en los ensayos "Mina Vieja" y 1.45 y 480 mV en los ensayos "Vampiro", luego del primer ciclo de irrigación de la etapa de biodepiritización.

Proceso de biodepiritización

La figura 2 muestra el pH de los lixiviados antes y después de cada irrigación, durante la etapa de biodepiritización. En general, puede observarse que los ensayos "Mina Vieja" (figura 2a) obtuvieron menores valores que los ensayos "Vampiro" (figura 2b), donde la adi-

ción de cisteína tuvo un efecto acidificante. En los primeros 20 días de proceso, cuando se reemplazaba la mitad del lixiviado por agua destilada, el pH antes de la irrigación se incrementaba significativamente en todos los ensayos, mientras que los valores después de la irrigación se mantuvieron en el rango de 1.38 ± 0.10 y 1.43 ± 0.07 , en los ensayos "Mina Vieja" y "Vampiro" respectivamente. Después del día 20, aunque el pH antes de la irrigación variaba significativamente, cuando se reemplazaba la mitad de solución por agua destilada, los valores luego de la irrigación tuvieron un ligero incremento respecto a los valores de los días previos.

La figura 3 muestra el comportamiento del Eh durante la etapa de biodepiritización. A nivel general, los ensayos no tuvieron diferencias en sus valores antes y después de la irrigación, en los primeros días de proceso. A partir del día 12, el Eh antes de la irrigación incrementó considerablemente para todos los ensayos, especialmente "Vampiro" (Eh alrededor de 650 mV, figura 3b), mientras que los valores luego de la irrigación aumentaron con una pendiente menos pronunciada, especialmente en los ensayos "Mina Vieja" (figura 3a), que no superaron los 560 mV. Al vigésimo día, el reemplazo total de la solución por agua destilada, no afectó los valores después de la irrigación, los cuales preservaron la misma tendencia. Después

del vigésimo segundo día y hacia el final del proceso, los ensayos "Mina Vieja" ajustaron sus valores alrededor de 550 mV y los ensayos "Vampiro" alrededor de 570 mV. Por otra parte, la adición de cisteína hizo que los ensayos "Mina Vieja" alcanzaran valores más altos antes de la irrigación que sus contrapartes sin el aminoácido. En contraste, el aminoácido disminuyó ligeramente el Eh en los ensayos "Vampiro".

La figura 4 muestra el hierro removido de los carbones durante todas las etapas del proceso. Todos los ensayos presentaron remoción durante la etapa de acidificación, la cual fue mucho mayor en los ensayos "Vampiro". Durante la etapa de biodepiritización, se observó un aumento continuo en el hierro removido en todos los ensayos, aunque con una velocidad menor que la observada en la etapa de acidificación. A partir de los ensayos con adición de cisteína, puede observarse que el aminoácido tuvo un efecto positivo significativo sobre este parámetro en los ensayos "Mina Vieja", mientras que en los ensayos "Vampiro" sólo se observó su efecto a partir del vigésimo sexto día. Por otra parte, en la etapa de lavado, el agua destilada removió parte de hierro remanente de las etapas anteriores.

La tabla 2 muestra los porcentajes de pirita oxidada y sulfato removido para todos los ensayos al final de todas las etapas del proceso. Los ensayos "Vampiro"

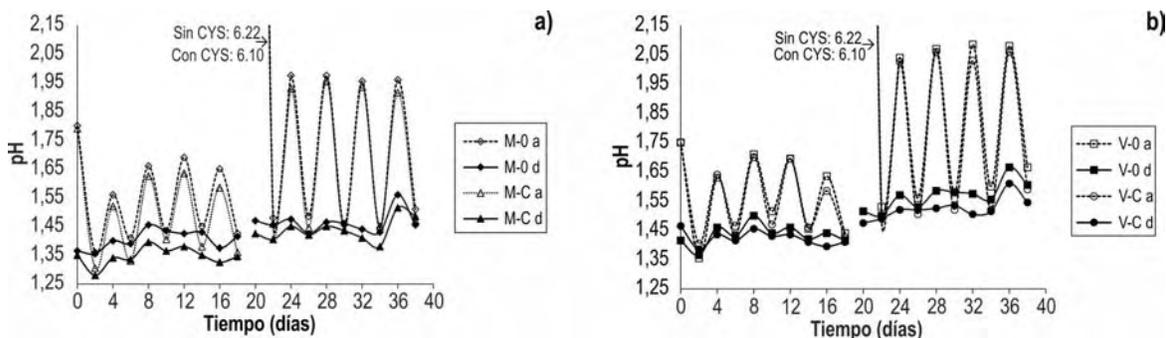


Figura 2. Comportamiento del pH vs. tiempo antes (a) y después (d) de cada irrigación en la etapa de biodepiritización, utilizando 0 mg Cys/L (0) y 60 mg Cys/L (C) en los ensayos: a) "Mina Vieja" (M) y b) "Vampiro" (V).

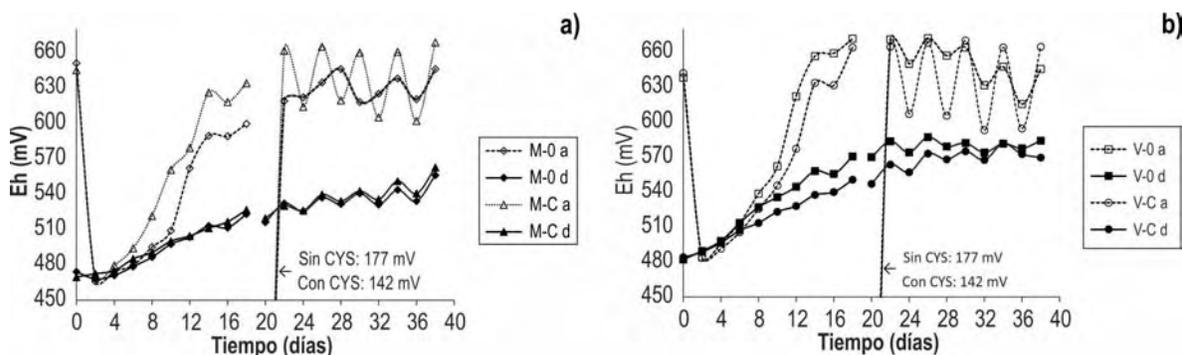


Figura 3. Comportamiento del Eh vs. tiempo antes (a) y después (d) de cada irrigación en la etapa de biodepiritización, utilizando 0 mg Cys/L (0) y 60 mg Cys/L (C) en los ensayos: a) "Mina Vieja" (M) y b) "Vampiro" (V).

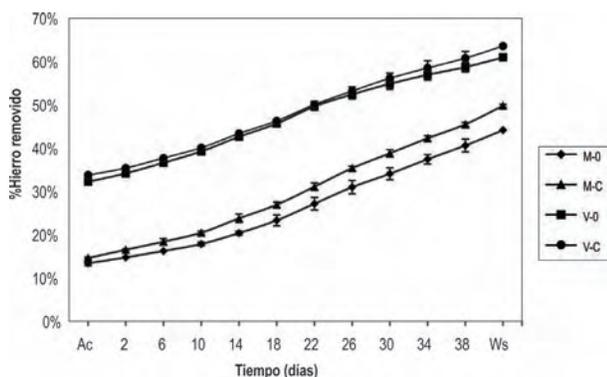


Figura 4. Comportamiento del hierro removido vs. tiempo durante todas las etapas del proceso. M: “Mina Vieja”, V: “Vampiro”, 0: 0 mg Cys/L, C: 60 mg Cys/L, Ac: etapa de acidificación y Ws: etapa de lavado.

obtuvieron mejores resultados que los ensayos “Mina Vieja”. Por otra parte, la adición de cisteína sólo tuvo un efecto significativo sobre el carbón “Mina Vieja”, incrementando la oxidación de pirita en 14.9% y la remoción de sulfatos en 10.9%, respecto a la obtenida en el ensayo sin adición de aminoácido, mientras que en los ensayos “Vampiro” estos porcentajes fueron de 6.39% y 0.95%.

Tabla 2. Pirita oxidada y sulfato removido al final de los procesos. M: “Mina Vieja”, V: “Vampiro”, 0: 0 mg Cys/L y C: 60 mg Cys/L.

Ensayo	Pirita oxidada (%)	Sulfato removido (%)
M-0	45.3 ± 0.8	43.3 ± 2.2
M-C	52.0 ± 1.2	48.1 ± 0.9
V-0	57.9 ± 2.3	80.3 ± 4.2
V-C	61.6 ± 2.5	81.2 ± 2.8

Análisis Mineralógicos

La figura 5 muestra los difractogramas para las muestras tratadas comparados con los espectros de los carbones originales. A nivel general, los difractogramas de ambos carbones evidenciaron presencia de pirita (FeS_2), caolinita ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$) y cuarzo (SiO_2), los cuales, con excepción del cuarzo, se expresan con mayor intensidad en “Mina Vieja”. También se observó una curvatura en la línea base entre $2\theta = 13^\circ - 23^\circ$, interpretada como debida a la fase amorfa del carbón (Lu et al., 2001). Adicionalmente, “Mina Vieja” evidenció jarosita ($\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$), mientras que “Vampiro” contuvo rozenita ($\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Una vez terminada la experimentación, todos los difractogramas de los carbones tratados mostraron disminución en los picos

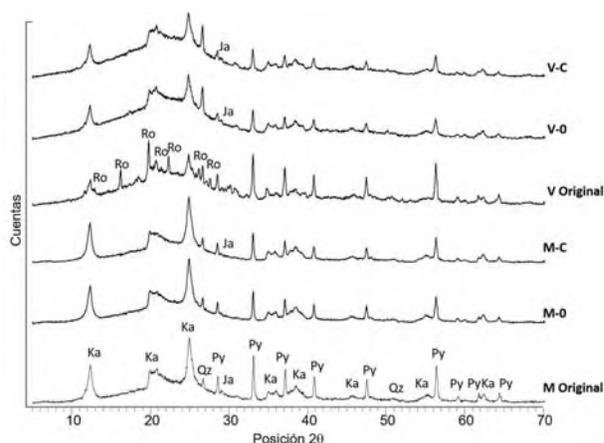


Figura 5. Difractogramas de los carbones antes y después del proceso en lecho empacado. M: “Mina Vieja”, V: “Vampiro”, 0: 0 mg Cys/L, C: 60 mg Cys/L, Ka: caolinita, Qz: cuarzo, Py: pirita, Ja: jarosita, Ro: Rozenita.

de pirita y aparición de pequeños picos de jarosita. Adicionalmente los ensayos “Mina Vieja” presentaron variaciones de los picos de caolinita, especialmente los comprendidos entre 20° y 23° , mientras que en los ensayos “Vampiro” se observó una desaparición total de rozenita.

La tabla 3 muestra las composiciones de los minerales a partir del refinamiento de Rietveld de los difractogramas de la figura 5, para las muestras originales y tratadas, sin considerar la fase amorfa (Kniess et al., 2012) y considerando el análisis químico de azufre pirítico (tabla 1), con un índice de bondad de ajuste (*goodness of fit*: GOF) alrededor de 1.1% y un perfil residual ponderado (*weighted residual profile*: R_{wp}) por debajo del 18%, que determinaron que el modelo de refinamiento fue bueno para aceptar los valores obtenidos (Kniess et al., 2012; Simanjuntak & Sembiring, 2011). Los ensayos “Mina Vieja” presentaron una reducción significativa en el porcentaje de caolinita. Por otra parte, en los ensayos “Vampiro” se corroboró la desaparición de rozenita; sin embargo, no se apreciaron variaciones significativas en el porcentaje de caolinita. Los ensayos con ambos carbones evidenciaron un leve aumento del cuarzo y proporciones de jarosita menores a 0.5%.

Discusión

Los resultados encontrados en este trabajo mostraron que los componentes del carbón (caolinita, matriz orgánica, hierro no pirítico) pueden afectar, en gran parte, la remoción de sulfatos y la biooxidación de pirita. Sin embargo, estos compuestos se pueden controlar a partir de todas las etapas ejecutadas para cada ensayo.

A nivel general, la acidificación permitió eliminar hasta un 80% del hierro no pirítico de ambos carbones (figura 4), especialmente en los ensayos con el carbón

Tabla 3. Porcentajes de caolinita y cuarzo en los carbones, antes y después del proceso en lecho empacado. M: “Mina Vieja”, V: “Vampiro”, 0: 0 mg Cys/L, C: 60 mg Cys/L, Ja: Jarosita, Ka: caolinita, Py: pirita, Qz: cuarzo, Ro: Rozenita.

Muestra	Py (%w)	Ka (%w)	Qz (%w)	Ro (%w)	Ja (%w)
M _{sin tratar}	7.50	28.86	1.69	-	<0.50
M-0	4.11	17.73	2.51	-	<0.40
M-C	3.60	18.20	2.47	-	<0.40
V _{sin tratar}	5.01	14.96	3.42	4.16	-
V-0	2.11	14.08	4.33	-	<0.20
V-C	1.92	12.65	4.10	-	<0.20

“Vampiro” (el cual presentó estos compuestos en mayor proporción, tabla 1). Esto es importante, debido a que altas concentraciones de hierro pueden generar sobresaturación en la solución lixivante cuando la proporción carbón/líquido es alta, lo cual puede inducir a la precipitación de sales (hidroxi) sulfatos de hierro insolubles (como jarosita), que afectarían el porcentaje de biodesulfurización global al depositarse nuevamente sobre la superficie del carbón (Cara *et al.*, 2006, 2001).

Adicionalmente, el reemplazo de la mitad de la solución lixivante por agua destilada, durante la etapa de biodepiritización, pudo contribuir a que se observase una remoción continua de hierro, sin notar caídas en los valores (figura 4), puesto que ayudó a mantener una concentración de hierro baja, evitando la precipitación de sulfatos (Cara *et al.*, 2001). Por otra parte, la etapa de lavado permitió remover una porción de sales de hierro remanentes luego de la biodepiritización. Aunque la tabla 2 indicó que no todo el sulfato fue solubilizado, probablemente porque las especies salinas remanentes tenían un grado de solubilidad bajo (ej.: jarosita, tabla 3), la concentración de sulfatos de los carbones tratados fue mucho menor (en comparación con el carbón original) lo cual aporta significativamente al grado de desulfurización global.

Respecto a los valores de pH y Eh (figuras 2 y 3), se observaron variaciones significativas antes y después de la irrigación. Para propósitos de análisis, los valores antes de la irrigación explican los procesos de biooxidación llevados a cabo por los microorganismos durante su estancia en el agitador orbital, sin entrar en contacto con el carbón; mientras que a partir de los resultados después de la irrigación se pueden explicar los fenómenos ocurridos dentro de la columna, respecto a las interacciones entre el carbón y los microorganismos, más la solución lixivante remanente que fueron adsorbidos.

Comportamiento del pH – Etapa de biodepiritización

Aunque la solución antes de la irrigación presentaba valores variables y altos en todos los ensayos (especial-

mente cuando se hacía reemplazo por agua destilada), el comportamiento después de la irrigación mantuvo valores dentro de un rango estable en la mayor parte del proceso (figura 2). Teniendo en cuenta los mecanismos de biooxidación de pirita (Sand *et al.*, 2001), se puede deducir que los microorganismos presentes en la solución adsorbida por el lecho empacado fueron capaces de producir suficientes iones H⁺, para acidificar el proceso y contrarrestar cualquier aumento en el pH, generado por la biooxidación de iones Fe²⁺ y/o las interacciones con la caolinita presente en los carbones (Malik *et al.*, 2004; Panda *et al.*, 2010).

Hay que tener en cuenta que el reemplazo de una porción de la solución por agua destilada, además de controlar la concentración de hierro, también pudo evitar que el sistema sufra una acidificación excesiva, manteniendo los valores en un rango idóneo para los microorganismos. Esto es importante, pues si el pH se acerca a 1 puede ocurrir inhibición de la actividad bacteriana de *A. ferrooxidans*, los microorganismos encargados de la biorregeneración de iones Fe³⁺, necesarios para la oxidación de pirita (Caicedo *et al.*, 2011; Daoud & Karamanev, 2006; Nemat *et al.*, 1998). Cabe señalar que los valores ligeramente menores de pH después de la irrigación, en los ensayos con adición de cisteína, fueron debidos en parte a la acidez aportada por este aminoácido (Rojas-Chapana & Tributsch, 2000), lo cual pudo influir sobre la mayor velocidad de remoción de hierro, especialmente señalada para el ensayo “Mina Vieja” en la primera etapa del proceso y para “Vampiro” en la segunda (figura 4), aunque no influyó significativamente sobre la remoción de sulfatos en el carbón (tabla 2).

Comportamiento del Eh – Etapa de biodepiritización

Los resultados obtenidos antes y después de la irrigación (figura 3) dan indicio que el carbón reguló la biooxidación de iones Fe²⁺, puesto que el Eh explica los cambios en la razón Fe³⁺/Fe²⁺ dentro del proceso (Meruane, 2002). Al comparar el comportamiento de este parámetro entre todos los ensayos (figura 3), la disminución significativa del valor del inóculo libre de

carbón al día 0 y la tendencia por debajo de 500 mV antes y después de la irrigación en los primeros 4 días denotan una reducción en la velocidad de biooxidación de iones Fe^{2+} , frente al consumo de iones Fe^{3+} en la oxidación de pirita, lo cual pudo generar la razón $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ baja en la solución adsorbida en el lecho empacado. En cambio, en el lixiviado que se llevaba al agitador orbital, libre del efecto del carbón, el microorganismo probablemente recuperó su actividad original.

Respecto al efecto del carbón, dos componentes del material pueden ser los responsables de reducir la actividad bacteriana: (i) la caolinita, por liberar concentraciones de aluminio durante su interacción con los iones H^+ de la solución, que pueden ser tóxicas para los microorganismos (Malik *et al.*, 2004; Panda *et al.*, 2010) y (ii) la matriz orgánica, por desprendimiento de compuestos orgánicos tóxicos para las bacterias, fricción y colisión entre partículas, que pueden causar daño celular o limitación del oxígeno disuelto (Acharya *et al.*, 2001; Beyer *et al.*, 1986; Caicedo & Márquez, 2013; Loi *et al.*, 1994; Malik *et al.*, 2004; Ryu *et al.*, 1993).

En cuanto al efecto de la disolución de caolinita (tabla 3), podría asumirse que la presencia de iones Al^{3+} en la solución de irrigación se mitigaba, cuando se reemplazaba una parte de esta por agua destilada, lo cual reducía la toxicidad generada en la medida que avanzaba el proceso, permitiendo un incremento en la actividad bacteriana. Esta pudo ser una de las razones por las cuales la solución recolectada después de la irrigación alcanzaba altas razones de oxidación de iones Fe^{2+} a partir del doceavo día, cuando se llevaba al agitador orbital.

Adicionalmente se observó que los ensayos “Vampiro”, cuya proporción de caolinita fue menor y reportó una mínima lixiviación de la misma (tabla 2), presentaron incrementos más altos en el potencial de óxido-reducción en la solución después de la irrigación durante todo el proceso, con una diferencia significativa desde los primeros días, respecto a los resultados obtenidos para los ensayos “Mina Vieja” (figura 3). Esto quiere decir que a menor cantidad de caolinita (tabla 3) hay menos cantidad de iones Al^{3+} lixiviados, permitiendo que la actividad bacteriana en la regeneración de iones Fe^{3+} se vea menos inhibida. Lo anterior, evidencia la probable relación existente entre la velocidad de regeneración de iones Fe^{3+} y la proporción de caolinita de los carbones. Sin embargo, aunque la caolinita no tuvo un mayor efecto sobre el proceso en los ensayos “Vampiro”, los resultados encontrados evidencian la influencia por parte de la matriz orgánica.

Es importante tener en cuenta que, en un lecho empacado, el material se encuentra estático (sin agitación), por lo que las interacciones de colisión y deslizamiento entre partículas, observadas en procesos de biodesulfurización en suspensión (Beyer *et al.*, 1986; Loi *et al.*,

1994; Ryu *et al.*, 1993), se anularían en su totalidad. Por lo tanto, los microorganismos adsorbidos dentro del carbón no incurrirían en inconvenientes como rompimiento celular, incluso permitiéndoles adherirse dentro del material. Adicionalmente, en estos procesos existiría una mínima probabilidad de desprendimiento de micropartículas de compuestos orgánicos, inhibidores de microorganismos acidófilos. Incluso, algunos remanentes de la superficie de los granos luego de la molienda del material pudieron desaparecer durante la etapa de acidificación (Loi *et al.*, 1994; Malik *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta lo anterior y con base estudios de biooxidación de pirita en pilas (Bennett & Ritchie, 2004; Bouffard & Dixon, 2009), el efecto de la matriz orgánica si pudo incidir sobre la transferencia de oxígeno disuelto, pudiéndose crear gradientes de concentración del gas a lo largo de la columna, que reducirían la cantidad disponible durante la oxidación del sulfuro, implicando otra probable causa de la disminución de la velocidad de biooxidación de iones Fe^{2+} , en comparación al proceso que se lleva a cabo en la solución cuando está en el agitador orbital (Caicedo *et al.*, 2011).

En cuanto a los ensayos con adición de cisteína, se observó una disminución en el Eh cuando se reemplazaba la mitad de la solución por agua destilada (figura 3). Probablemente se debió a la adición de aminoácido fresco, en ese instante de tiempo, la cual tuvo un efecto reductor sobre los iones Fe^{3+} . No obstante, esto no afectaba los valores después de la irrigación, ni durante la etapa donde no se hacía el cambio de solución, indicando un efecto adsorbente del carbón sobre el aminoácido (Jackson, 1970; Linares-Solano *et al.*, 2000; Teng *et al.*, 1998). Lo anterior también da indicio que los iones Fe^{3+} de la solución irrigada no son los que predominan sobre la biooxidación de pirita, sino las interacciones que ocurren en la solución adsorbida dentro de la columna.

Es importante señalar que el ensayo “Mina Vieja” presentó un incremento en la razón $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ antes de la irrigación, mas no tuvo variaciones en los valores después de la irrigación respecto al ensayo sin aminoácido (figura 3). Se sabe que *A. thiooxidans* no oxida pirita, pero en sistemas similares al de los experimentos puede degradar cisteína (Kodama & Mori, 1968). Podría pensarse que los compuestos producidos a partir de la cisteína degradada pudieron fortalecer la resistencia de *A. ferrooxidans* a la toxicidad generada por los iones Al^{3+} (solubilizados de la caolinita), lo cual permitiría incrementar la velocidad de regeneración de iones Fe^{3+} en solución.

A la fecha, y a excepción de este trabajo, no existen reportes que demuestren que las interacciones cisteína-*A. thiooxidans* intra o extracelulares puedan mejorar las defensas de los microorganismos acidófilos frente a la toxicidad del aluminio, ni muchos menos que pueda ser traspasado a bacterias en consorcio como *A.*

ferrooxidans. Sin embargo, en estudios botánicos recientes, se ha observado cómo las células vegetales pueden resistir altas concentraciones de aluminio en suelos ácidos, mediante degradación de cisteína por enzimas L-cisteína desulfhidrasas, las cuales producen sulfuro de hidrógeno (H_2S), que bloquea la toxicidad de los iones Al^{3+} (Chen *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2013). Debido a que la acción tóxica del aluminio hacia los microorganismos acidófilos es similar a la de las células vegetales, de acuerdo con su rango taxonómico esperado, se sugiere que *A. thiooxidans* pudo ser capaz de llevar a cabo el mecanismo de reacción de la ruta L-cisteína desulfhidrasa en los ensayos de este trabajo (Caspí *et al.*, 2010), permitiendo así reducir la inhibición por la presencia de caolinita.

El proceso se explicaría hipotéticamente de la siguiente forma: (i) cuando se irrigaba la solución lixiviante (conteniendo cisteína), la caolinita y la matriz orgánica del carbón, al encontrarse en mayor proporción que la pirita, adsorberían una cantidad considerable de aminoácido, lo que reduciría su interacción con el sulfuro. (ii) A pesar de que el aminoácido fuera adsorbido sobre la matriz orgánica y la caolinita, podría haber sido degradado por *A. thiooxidans*, produciendo los compuestos que ayudarían a mitigar la toxicidad de los iones Al^{3+} . (iii) Al tratarse de un proceso en lecho empacado, la concentración de los compuestos producidos a partir de la degradación de cisteína no habría sido uniforme en los diferentes puntos de la columna (Bennett & Ritchie, 2004; Bouffard & Dixon, 2009), lo cual reduciría su efecto en algunas zonas. No obstante, después de la irrigación, su solubilización permitiría mitigar el efecto de los iones Al^{3+} en la solución cuando se llevó al agitador orbital, puesto que bajo agitación la concentración si sería uniforme.

Por otra parte, en el ensayo “Vampiro” con adición de cisteína, el aminoácido pareció no tener un efecto positivo sobre los valores de Eh. Como se explicó anteriormente, la solubilización de caolinita en los ensayos con este carbón fue mínima (tabla 3), y probablemente las concentraciones de iones Al^{3+} lixivadas no afectaron notablemente la biooxidación de iones Fe^{2+} , por lo que el efecto de la adición de cisteína sería menos significativo.

Comportamiento del hierro removido y oxidación de pirita – Etapa de biodepiritización

La remoción considerable de hierro durante la etapa de acidificación (figura 4) puede atribuirse a lixiviación de gran parte del hierro no pirítico (tabla 1). Por lo tanto, los cambios observados durante la biodepiritización pueden relacionarse principalmente a la oxidación de pirita.

Al comparar el porcentaje de hierro removido total de todos los ensayos (figura 4) respecto al porcentaje de pirita oxidada (tabla 2), pudo observarse que la solu-

bilización de este elemento fue parcial. Esto también coincide con el porcentaje de sulfato removido del carbón (tabla 2), indicando la probable generación de precipitados de hierro producto de la oxidación de pirita (Daoud & Karamanev, 2006). No obstante, ya que la remoción de hierro presentó una tendencia continua (figura 4), sin mostrar caídas en los valores, y hubo una reducción del sulfato inicial (tabla 2), puede deducirse que la precipitación de los productos de oxidación de pirita en la interfase líquido-sólido fue menor a la cantidad que se lixivaba en cada irrigación.

Los incrementos observados por la adición de cisteína fueron bajos comparados con los obtenidos por otros autores, en ensayos con pirita pura de fino espesor (Rojas-Chapana & Tributsch, 2000). En un proceso de biodesulfurización, la distribución heterogénea de forma y tamaño de la pirita puede reducir el comportamiento cinético de las interacciones del aminoácido con el sulfuro, así como su adsorción sobre los compuestos del carbón. No obstante, al ver que la cisteína tuvo un mejor efecto sobre los ensayos con el carbón “Mina Vieja”, probablemente su acción es más relevante cuando la concentración de iones Al^{3+} afecta la actividad bacteriana, donde el efecto mitigante de las interacciones *A. thiooxidans*-cisteína jugaría un papel importante.

Conclusiones

Los componentes del carbón (principalmente la matriz orgánica y la caolinita) jugaron un papel importante en los procesos de biodepiritización mediados por *A. ferrooxidans*, principalmente como controladores de la proporción Fe^{3+}/Fe^{2+} , influyendo directamente sobre la oxidación de pirita. En este trabajo, la caolinita en el carbón pudo ser el componente que más limitó la velocidad de la biorregeneración de Fe^{3+} , mediada por *A. ferrooxidans*, ya que, su disolución en medio ácido liberaría iones Al^{3+} , los cuales, son tóxicos para los microorganismos en altas concentraciones, lo que repercutiría negativamente sobre los porcentajes de oxidación de pirita, afectando la eficiencia del proceso.

En cuanto a la adición de cisteína, se observó que, aunque mejora el índice de oxidación de pirita, pierde efecto en presencia de carbón, al compararse con resultados de trabajos de otros autores en pirita pura. La caolinita y la matriz orgánica del carbón pudieron adsorber el aminoácido, reduciendo la probabilidad de que interactúe con el sulfuro. No obstante, *A. thiooxidans*, presente en el consorcio, pudo haber roto los enlaces entre el carbón y la cisteína adsorbida, produciendo compuestos que evitaron los efectos tóxicos de los iones Al^{3+} (lixiviados de la caolinita). Se requiere el uso de técnicas analíticas a nivel molecular que permitan ver de forma directa, si efectivamente ocurrió el escenario supuesto en este trabajo. Esto también ayudaría a entender qué aditivos específicos se pueden

utilizar en presencia de diferentes tipos de materiales o minerales a tratar.

Aunque no se obtuvieron incrementos en la oxidación de pirita similares a los reportados para pirita pura, este trabajo es un indicio de cómo la combinación de ciertos compuestos, en presencia de microorganismos acompañantes en el consorcio, pueden mejorar la velocidad y la cinética del proceso en ambientes poco favorables.

Agradecimientos

Al Laboratorio de Biomineralogía de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, donde se desarrolló toda la fase de experimentación.

Referencias bibliográficas

- Acharya, C., Kar, R. N., & Sukla, L. B. (2001). Bacterial removal of sulphur from three different coals. *Fuel*, *80*, 2207–2216.
- Bennett, J. W., & Ritchie, A. I. M. (2004). A proposed technique for measuring in situ the oxidation rate in biooxidation and bioleach heaps. *Hydrometallurgy*, *72*, 51–57.
- Beyer, M., Ebner, H. G., & Klein, J. (1986). Influence of pulp density and bioreactor design on microbial desulphurization of coal. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *24*, 342–346.
- Bouffard, S. C., & Dixon, D. G. (2009). Modeling the performance of pyritic biooxidation heaps under various design and operating conditions. *Hydrometallurgy*, *95*, 227–238.
- Caicedo, G. A., & Márquez, M. A. (2013). Effect of chloride salts on biodesulfurization process of a Colombian coal. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, *68*, 115–123.
- Caicedo, G. A., Márquez, M. A., & Moreno, C. X. (2011). Particle size, iron concentration and pH influence in biodesulfurization process of coal – laboratory tests. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *13*(2), 199–209.
- Caicedo, G. A., Prada, M., Peláez, H., Moreno, C. X., & Márquez, M. A. (2012). Evaluation of a coal biodesulfurization process (semi-continuous mode) on the pilot plant level. *Dyna*, *174*, 114–118.
- Cara, J., Aller, A., Otero, M., & Morán, A. (2001). Idle time in the washing and iron concentration in leachate removed: two basic parameters in the desulphurization of coal in a packed column. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *55*(1), 49–54.
- Cara, J., Vargas, M., Morán, A., Gómez, E., Martínez, O., & García Frutos, F. J. (2006). Biodesulphurization of a coal by packed-column leaching. Simultaneous thermogravimetric and mass spectrometric analyses. *Fuel*, *85*, 1756–1762.
- Cardona, I. C., & Márquez, M. A. (2009). Biodesulfurization of two Colombian coals with native microorganisms. *Fuel Processing Technology*, *90*, 1099–1106.
- Caspi, R., Altman, T., Dale, J. M., Dreher, K., Fulcher, C. A., Gilham, F., ... Karp, P. D. (2010). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Research*, *38*(Database issue), D473–9.
- Chen, J., Wang, W.-H., Wu, F.-H., You, C.-Y., Liu, T.-W., Dong, X.-J., ... Zheng, H.-L. (2012). Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in barley seedlings. *Plant and Soil*, *362*, 301–318.
- Daoud, J., & Karamanev, D. (2006). Formation of jarosite during Fe²⁺ oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Minerals Engineering*, *19*, 960–967.
- Fu, P., Wang, W., Hou, L., & Liu, X. (2013). Hydrogen sulfide is involved in the chilling stress response in *Vitis vinifera* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, *82*, 295–302.
- Jackson, T. A. (1970). Evidence for selective adsorption and polymerization of the L-optical isomers of amino acids relative to the D-Optical isomers on the edge faces of kaolinite. *Experientia*, *27*, 242–244.
- Kniess, C. T., Cardoso de Lima, J., & Prates, P. B. (2012). The Quantification of Crystalline Phases in Materials: Applications of Rietveld Method. in *Sintering - Methods and Products*, ISBN: 978-953-51-0371-4, 293–316.
- Kodama, A., & Mori, T. (1968). Studies on the metabolism of a sulfur-oxidizing bacterium IV. Growth and oxidation of sulfur compounds in *Thiobacillus thiooxidans*. *Plant & Cell Physiology*, *9*, 709–723.
- Linares-Solano, A., Martín-Gullón, I., Salinas-Martínez de Lecea, C., & Serrano-Talavera, B. (2000). Activated carbons from bituminous coal: effect of mineral matter content. *Fuel*, *79*, 635–643.
- Liu, J., Wang, Z., Li, B. M., & Zhang, Y. H. (2006). Interaction between pyrite and cysteine. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, *16*, 943–946.
- Loi, G., Mura, A., Trois, P., & Rossi, G. (1994). Bioreactor performance versus solids concentration in coal biodepyritization. *Fuel Processing Technology*, *40*(2-3), 251–260.
- Lu, L., Sahajwalla, V., Kong, C., & Harris, D. (2001). Quantitative X-ray diffraction analysis and its application to various coals. *Carbon*, *39*, 1821–1833.
- Malik, A., Dastidar, M. G., & Roychoudhury, P. K. (2004). Factors limiting bacterial iron oxidation in biodesulphurization system. *International Journal of Mineral Processing*, *73*, 13–21.
- Meruane, G. (2002). Oxidación Bacteriana de Sulfato Ferroso. Chile: Tesis de maestría, Universidad de Chile, p 180.
- Nemati, M., Harrison, S. T. L., Hansford, G. S., & Webb, C. (1998). Biological oxidation of ferrous sulphate by *Thiobacillus ferrooxidans*: a review on the kinetic aspects. *Biochemical Engineering Journal*, *1*, 171–190.
- Panda, A. K., Mishra, B. G., Mishra, D. K., & Singh, R. K. (2010). Effect of sulphuric acid treatment on the physico-chemical characteristics of kaolin clay. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *363*, 98–104.
- Rojas-Chapana, J. A., & Tributsch, H. (2000). Bio-leaching of pyrite accelerated by cysteine. *Process Biochemistry*, *35*, 815–824.
- Rossi, G. (2013). The Microbial Desulfurization of Coal. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer. doi:10.1007/10_2013_178
- Ryu, H. W., Chang, Y. K., & Kim, S. D. (1993). Microbial coal desulfurization in an airlift bioreactor by sulfur-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Fuel Processing Technology*, *36*, 267–275.
- Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P. G., & Schippers, A. (2001). (Bio) chemistry of bacterial leaching—direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*, *59*, 159–175.
- Schippers, A., & Sand, W. (1999). Bacterial Leaching of Metal Sulfides Proceeds by Two Indirect Mechanisms via Thiosulfate or via Polysulfides and Sulfur. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*, 319–321.
- Simanjuntak, W., & Sembiring, S. (2011). The use of the Rietveld Method to study the phase composition of cordierite (Mg₂Al₄Si₅O₁₈) ceramics prepared from rice husk silica. *Makara, Sains*, *15*, 97–100.
- Teng, H., Yeh, T.-S., & Hsu, L.-Y. (1998). Preparation of activated carbon from bituminous coal with phosphoric acid activation. *Carbon*, *36*, 1387–1395.
- Tuovinen, O. H., & Kelly, D. P. (1973). Studies on Growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable numbers, and comparison with ¹⁴CO₂-Fixation and Iron Oxidation as Measures of Growth. *Archiv Für Mikrobiologie*, *88*, 285–298.

Tratamiento de cáncer de seno y farmacogenética

Treatment of breast cancer and pharmacogenetics

Yeimy Viviana Ariza Márquez*, Ignacio Briceño Balcázar**, Fabio Ancízar Aristizábal***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57723

Resumen

El cáncer de seno es un grupo de enfermedades con gran impacto a nivel mundial dado que es una de las patologías con mayor prevalencia en mujeres y el cáncer con mayor tasa de mortalidad en varios países (GLOBOCAN 2012). El uso de la farmacogenética y farmacogenómica, en pacientes con cáncer de seno tiene como fin, generar una salud personalizada que permita tratar a cada paciente como individuo y no como enfermedad, pues cada paciente tiene necesidades particulares a la hora de suministrarle un tratamiento. El propósito de esta revisión es identificar las variantes genéticas reportadas en la literatura científica, donde se evalúan diferentes poblaciones y su posible uso como herramienta para medicina de precisión. En población colombiana es poca la caracterización poblacional que existe y por tanto estudios poblacionales son necesarios para definir los perfiles genéticos que deberán implementarse en nuestra población.

Palabras clave: cáncer de seno, farmacocinética, tamoxifeno, hormonoterapia.

Abstract

Breast cancer is one of the most prevalent diseases in women with increasing mortality in several countries (GLOBOCAN 2012). The use of pharmacogenetics and pharmacogenomics in patients with breast cancer allows generating personalized health for treating each patient as an individual, as each patient has unique needs when supplying a treatment. The purpose of this review is to identify genetic variants reported in the scientific literature, where different populations are evaluated and for possible use as a tool for medical precision. Colombian population is unique and therefore population studies are needed to define the genetic profiles to be implemented.

Key words: breast cancer, pharmacokinetic, tamoxifen, hormone therapy.

Recibido: septiembre 18 de 2015

Aprobado: abril 12 de 2016

Definición y conceptos generales de cáncer de seno

El cáncer de seno esta conformado por un grupo de neoplasias malignas que tiene su origen en la proliferación acelerada a causa de pérdida del control del ciclo celular por alteración en al menos uno de los siguientes genes: *BRCA1*, *BRCA2*, *P53* y *PTEN*, y en otros casos por razones desconocidas (Dunning *et al.*, 1999). Puede estar localizado a nivel de los ductos o los lobulillos siendo el ductal el más frecuente. El término «Carcinoma *in situ*» se refiere al tipo de cáncer que se encuentra confinado en la luz de los ductos o de los lobulillos glandulares, sin invadir los tejidos vecinos. Por su parte, el carcinoma invasivo prolifera hasta romper la llamada membrana basal y extender-

se infiltrando los tejidos que rodean a los ductos y lobulillos mamarios, penetrando así el tejido circundante (McCafferty *et al.*, 2009).

Epidemiología

Se presenta tanto en hombres y mujeres, aunque el cáncer de mama femenino es más frecuente. Las cifras reportadas para mortalidad por cáncer de seno en el periodo del 2000- 2006 en Colombia fueron de 12.287 personas, con una tasa cruda de 8,3 anual y una tasa ajustada por edad de 9,2 anual (Piñeros *et al.*, 2010), adicionalmente, de acuerdo a lo reportado por GLOBOCAN (2012) la tasa de incidencia de cáncer de seno en mujeres para Colombia fue del 23,4% (8.686

* cPh.D Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá yvarizam@unal.edu.co

** Profesor titular, Universidad de la Sabana y Pontificia Universidad Javeriana, ignaciobb@unisabana.edu.co

*** Ph.D., Director Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, faaristizabalg@unal.edu.co

casos) y la tasa de mortalidad fue del 13,8% (2.649 defunciones) (Ferlay *et al.*, 2012).

Clasificación cáncer de seno

Con el fin de clasificar los diferentes estadios de esta enfermedad se manejan diferentes esquemas, dentro de los que cabe mencionar, el sistema TNM que se basa en la clasificación por tamaño del tumor (T), si el tumor se ha diseminado a los ganglios linfáticos (N), en las axilas o aún no se ha diseminado, y si el tumor ha pasado a procesos metastásicos (M) y por otro lado la clasificación anatomopatológica, dentro de la que se evalúa; el estado de los receptores hormonales, grado histológico y tamaño. (Singletary *et al.*, 2002).

Actualmente la clasificación molecular es la más usada y está basada en análisis de microarreglos, donde se estratifica el cáncer mamario en cuatro subtipos: 1) luminal; 2) similar a basal; 3) similar a normal y 4) HER2/ERBB2, (Perou *et al.*, 2000; Sotiriou *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2016).

Para los procesos de clasificación se emplean los receptores de superficie, que median procesos de transcripción celular. En la glándula mamaria se expresan tres receptores importantes: receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) y receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2/neu). Estos receptores se encargan de llevar a cabo procesos de replicación que en condiciones fisiológicas normales mantienen el equilibrio celular, pero en procesos tumorales permiten la replicación de células tumorales que los sobre expresan y generan el rápido crecimiento del tumor. Aquellas células que no tengan ninguno de estos receptores se denominan basales o triple negativas (Dent *et al.*, 2007).

Estado del receptor de estrógenos

Los cánceres de seno se clasifican sobre la base de las necesidades de crecimiento como dependiente de estrógeno y tumor independiente de estrógenos (Stoll BA., 1969; Furth J., 1975; Lacroix y Leclercq, 2004). Los RE hacen referencia a un grupo de receptores celulares que son activados por la hormona denominada 17β -estradiol o estrógeno. Los RE son proteínas intracelulares que al unirse a su ligando favorecen su translocación al núcleo e inducción de la expresión de genes específicos. (De vita *et al.*, 1984). Al bloquear la actividad de estas hormonas con terapia hormonal, se detiene el crecimiento de las células del cáncer.

Estado de HER2. Se refiere a un oncogén que ayuda al crecimiento, división y reparación celular. Cuando las células tienen demasiadas copias de este gen, las células (incluyendo las cancerosas) se multiplican más rápidamente (Cabrera M. 2005; Piccart *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2008). Se sobre expresa en

aproximadamente 25-30 % de las pacientes con cáncer de seno. Esto está asociado a un aumento en la actividad biológica del tumor. Las pacientes con cáncer de mama que presentan amplificación de HER2/neu presentan generalmente una forma más agresiva de cáncer, además de una mayor resistencia a tratamientos convencionales. Sin embargo, son pacientes que responden mejor al tratamiento combinado de quimioterapia con trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado que se dirige contra el dominio extracelular del receptor Her2/neu, aumentando la tasa de supervivencia de las pacientes (McCafferty *et al.*, 2009).

Actualmente mediante la identificación de receptores hormonales se determina si las células cancerosas pueden reaccionar a un tratamiento en particular.

En la figura 1, se muestra la Guía de manejo de pacientes con cáncer de seno del INC del 2013 donde se indican las opciones de tratamiento para pacientes con cáncer de seno, estratificándolo en no invasivo, localmente diseminado y metastásico.

La terapia local tiene como objetivo tratar el tumor en un sitio específico, sin afectar el resto del cuerpo. La cirugía y la radioterapia son ejemplos de terapias locales (Rosenberg, S. A., 2000).

La terapia sistémica se administra por vía oral o directamente en el torrente sanguíneo para llegar a las células cancerosas que se hayan podido propagar más allá del seno. La quimioterapia, terapia hormonal y inmunoterapia son terapias sistémicas.

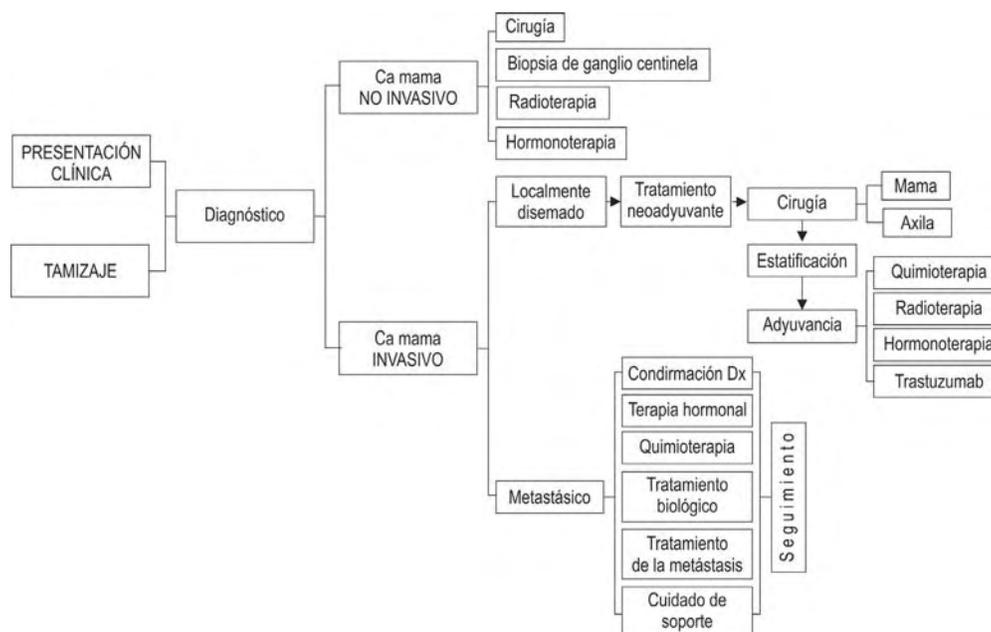
Dentro de las alternativas de tratamiento se encuentran medidas quirúrgicas que contemplan lumpectomía, cuadrantectomía, mastectomía y mastectomía bilateral, por otro lado la radioterapia, la quimioterapia y la hormonoterapia, son alternativas que suelen usarse de manera combinada.

Para el propósito de esta revisión nos centraremos en los polimorfismos identificados en respuesta a hormonoterapia y quimioterapéuticos.

Descripción de los principales hormono terapéuticos: Los medicamentos de hormonoterapia que se usan para tratar el cáncer de seno con receptores de hormonas positivos actúan de dos formas (figura 2):

- Reducción de la concentración de estrógeno en el cuerpo.
- Bloqueo de la acción del estrógeno en las células del cáncer de seno.

Los medicamentos indicados para la hormonoterapia también pueden utilizarse para ayudar a reducir o desacelerar el crecimiento del cáncer de seno *in situ*, en estado avanzado o metastásico con receptores hormonales positivos.



Protocolo de manejo pacientes cáncer de seno, Instituto Nacional de Cancerología (INC), 2013.

Figura 1. Algoritmo de manejo general en pacientes con Cáncer de seno. INC, 2013.

Existen varios tipos de medicamentos de hormonoterapia, entre los que se incluyen: inhibidores de aromatasa (IA), moduladores selectivos de los receptores de estrógeno y antagonistas del receptor de estrógeno, (figura 2), a continuación se describen cada uno de ellos.

Inhibidores de aromatasa

Detienen la producción de estrógeno en mujeres postmenopáusicas, mediante el bloqueo de la enzima aromatasa (ver figura 2), que convierte el andrógeno en pequeñas concentraciones de estrógeno en el cuerpo. Los inhibidores de aromatasa no pueden impedir que los ovarios produzcan estrógeno, por lo que solamente son adecuados para mujeres postmenopáusicas.

Los agentes anti aromatasas se clasifican en 2 grupos:

Inhibidores e inactivadores de aromatasas. Los inhibidores se unen de forma transitoria a la aromatasa y los inactivadores se unen de forma permanente a la enzima. En la actualidad están aprobados 2 inhibidores:

- Arimidex (nombre genérico: anastrozol)
- Femara (nombre genérico: letrozol)

Y un inactivador de aromatasas:

- Aromasin (nombre genérico: exemestano)

Moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (MSRE)

Son agentes que se unen al receptor de estrógeno donde simulan la actividad de los estrógenos en cier-

tos tejidos, mientras inhiben su acción en otros. Los MSRE tienen una variada actividad: compuestos con actividad totalmente agonista, como la hormona endógena estrógeno; compuestos con actividad agonista en algunos tejidos y antagonista en otros, como el tamoxifeno.

Tamoxifeno

Es un modulador selectivo de los receptores de estrógenos. Su mecanismo de acción se basa en su efecto antiestrogénico, bloquea la acción de esta hormona que estimula el desarrollo de las células tumorales (figura 2). Su acción no se limita a la mama, pues diferentes órganos tienen receptores para estrógenos. En el útero (figura 2) tiene un efecto agonista estrogénico y en el hueso mejora la asimilación de calcio, por lo que es beneficioso en la osteoporosis.

El tamoxifeno es considerado como un profármaco ya que necesita ser transformado a sus respectivos metabolitos, los cuales son los responsables de su actividad farmacológica. Este fármaco tiene metabolismo primario y secundario el cual se lleva a cabo en el hígado, principalmente por las enzimas del citocromo P450, (figura 3). (Higgins *et al.*, 2009 y Goetz *et al.*, 2005). Y dependiendo la integridad de los diversos citocromos los pacientes pueden ser caracterizados como metabolizador ultrarrápido (UM), metabolizador normal (EM), metabolizador intermedio (IM) y metabolizador lento (PM) (Rodríguez e Ingelman., 2006).

El N-desmetiltamoxifeno es el metabolito más abundante sin embargo no es el responsable de la activi-

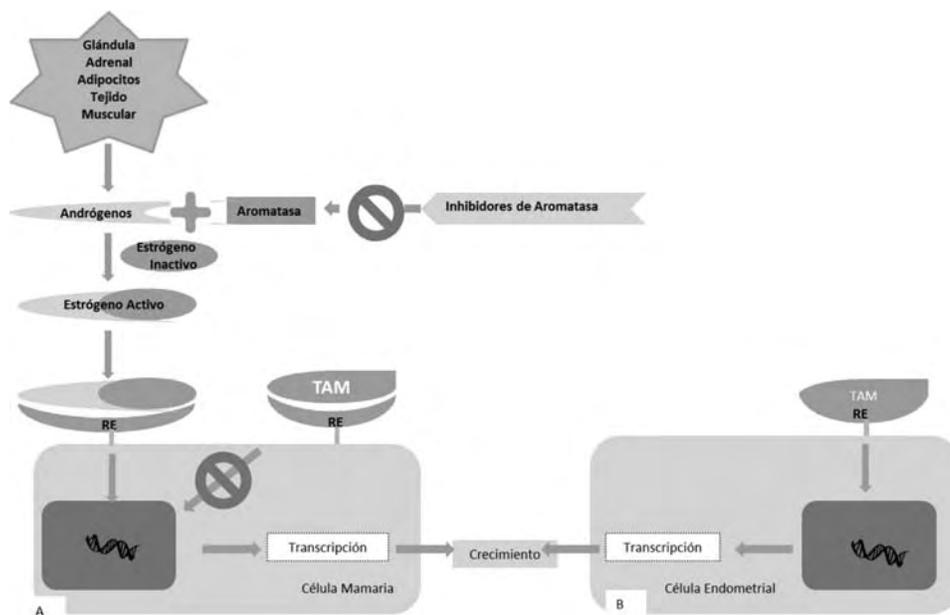


Figura 2. Síntesis de estrógenos, acción de hormonoterapéuticos y efecto del tamoxifeno sobre los receptores de estrógenos. Tamoxifeno (TAM) se une competitivamente a los receptores de estrógeno de tumores de seno produciendo un complejo nuclear que disminuye la síntesis de ADN e inhibe los efectos del estrógeno. Su acción no se limita a la mama, pues diferentes órganos tienen receptores para estrógenos (Figura 2B) (útero y hueso). En el útero tiene paradójicamente un efecto agonista estrogénico generando en algunos casos cáncer de útero y en el hueso mejora la asimilación de calcio, por lo que es beneficioso en la osteoporosis (Carpenter R. y Miller WR. 2005)

dad de tamoxifeno; el metabolito 4-hidroxitamoxifeno representa menos del 10 % de la oxidación primaria de tamoxifeno catalizada por las enzimas CYP3A4 y CYP3A5, (figura 3) sin embargo se considera que su papel en el efecto farmacológico es muy importante ya que tiene un efecto antiestrogénico 100 veces superior al del tamoxifeno. Estudios han demostrado que hay otro metabolito, el 4-hidroxi-N-desmetil tamoxifeno (endoxifeno) el cual es formado a partir de la oxidación de N-desmetiltamoxifeno catalizado por la enzima CYP2D6; endoxifeno es más importante que 4-hidroxitamoxifeno ya que contribuye de manera más

significativa en el efecto total anticanceroso de tamoxifeno, por lo tanto es el responsable de la actividad de este fármaco. (Goetz *et al.*, 2005).

Antagonistas del receptor de estrógeno (ARE)

Los antagonistas del receptor de estrógeno (ARE) bloquean los efectos del estrógeno en el tejido mamario. Los ARE funcionan de una forma similar a los (MSRE). Los ARE se unen a los receptores del estrógeno en las células mamarias. Si un ARE se une al receptor del estrógeno, no hay espacio suficiente para que el estrógeno se acople a la célula (figura 2). Si el estrógeno

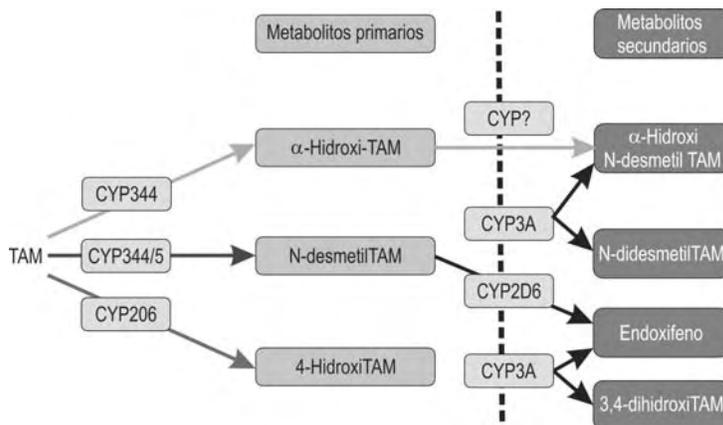


Figura 3. Metabolismo del tamoxifeno. Metabolitos primarios y secundarios. Tomado de Desta *et al.*, (2005).

no está unido a la célula de la mama, la célula no recibe las señales del estrógeno que le indican que debe crecer y multiplicarse. Además, los ARE tienen otros beneficios:

- Reducen la cantidad de receptores de estrógeno.
- Cambian la forma de los receptores de estrógeno en las células mamarias

Hay un ARE disponible para tratar el cáncer de mama de receptores de hormonas positivos:

Faslodex (nombre genérico: fulvestrant)

Fulvestrant es un medicamento que actúa por efecto antagonista sobre los receptores de estrógeno y se encuentra indicado para tratar a mujeres en edad postmenopáusica que presenten cáncer de mama en fase avanzada, únicamente en caso de que el tumor tenga receptores hormonales positivos y la enfermedad no responda a otros medicamentos bloqueantes de estrógenos, como el tamoxifeno. El mecanismo de acción del fármaco se basa en inactivar la acción de los estrógenos. El medicamento se presenta en forma de solución para administrar por vía intramuscular, la dosis habitual es 500 mg una vez al mes. Los efectos secundarios más frecuentes que se han observado consisten en dolor de cabeza, sensación de sofoco, vómitos o diarrea, erupción cutánea, dolor de espalda, reacciones alérgicas, aumento de los niveles de bilirrubina en sangre, fallo hepático, sensación de cansancio y riesgo aumentado de tromboembolismo.

Por otra parte, trastuzumab (comercializado con la marca Herceptin®) es un anticuerpo monoclonal humanizado. El trastuzumab se une selectivamente al receptor HER2. El HER2 se sobre expresa en la superficie de algunas células cancerosas y estimula la proliferación de éstas células. Cuando el trastuzumab se une al HER2 inhibe la proliferación celular. Trastu-

zumab se emplea en el tratamiento de pacientes con cáncer de seno que tienen expresión positiva del oncogén HER2. El trastuzumab es un producto biotecnológico producido en células de ovario de hámster chino (CHO) en cultivo.

Luego de revisar las diferentes alternativas de tratamiento y evaluando el esquema de manejo propuesto por el INC en el 2013, el hormonoterapéutico de primera elección es tamoxifeno, como previamente se sugirió en un estudio de costo-efectividad, donde se estableció tamoxifeno como la mejor alternativa para Colombia (Chicaíza, 2008) por otra parte los regímenes de quimioterapia están basados en antraciclina asociada o no con taxanos. De manera que en el contexto de respuesta a tratamiento es importante tener en cuenta todos los factores que pueden incidir en la respuesta a tratamiento en una paciente con cáncer de seno, para esto es preciso evaluar factores tales como condiciones subyacentes, características propias del fármaco y farmacogenéticos de cada paciente (figura 4).

Diversas condiciones pueden incidir en la respuesta a hormonoterapia, es el caso del estudio realizado por Simonsson *et al.*, (2013) donde se encontró que un moderado y alto consumo de café se asocia con una disminución significativa del riesgo de los primeros eventos en los pacientes tratados con tamoxifeno y el estado de los receptores hormonales. Si se confirma, quizás se justifique nuevas recomendaciones en relación con el consumo de café durante el tratamiento con tamoxifeno. Igualmente diversas publicaciones indican que la epigenética también incide en la respuesta a hormonoterapéuticos como el tamoxifeno. (Eccles *et al.*, 2013, Pathiraja, *et al.*, 2010, Van't Veer *et al.*, 2002).

En la tabla 1 se citan los principales polimorfismos asociados a respuesta en los diferentes tratamientos de hormonoterapia en pacientes con cáncer de seno.

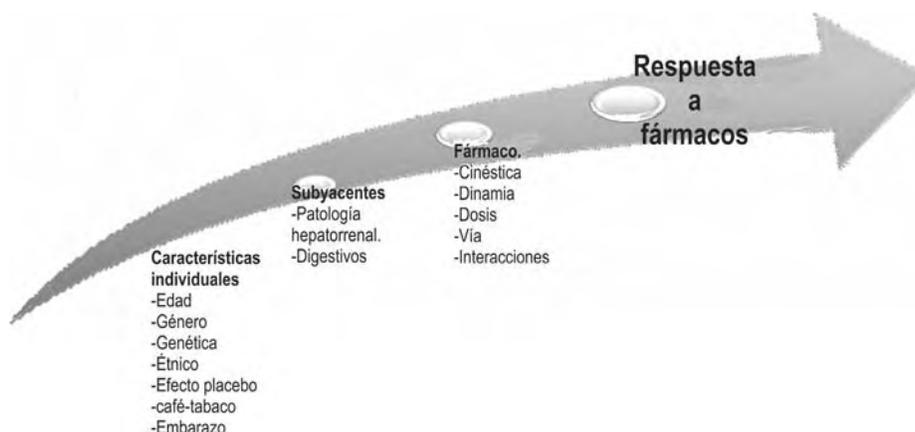


Figura 4. Factores que inciden en la respuesta a fármacos. En la figura se indican los factores individuales, propios del fármaco y condiciones subyacentes que inciden en la respuesta a un fármaco. Basada en Gurrola *et al.*, 2010.

Tabla 1. Variantes genéticas asociadas a respuesta en hormonoterapéuticos. (Saladores *et al.*, 2013).

Hormonoterapéuticos					
Alelos	Variante genética	SNP	Actividad Enzimática	Estado metabolizador	Referencia
CYP2D6*1			Normal o wild type	Normal TAM	(Kiyotani <i>et al.</i> , 2012)
CYP2D6*2	2850C>T	rs16947	Normal o wild type	Normal TAM	(Marcucci <i>et al.</i> , 2002)
CYP2D6*2	4180G>T	rs1135840	Normal	Normal TAM	(Muroi <i>et al.</i> , 2014)
CYP2D6*3	2549delA	rs35742686	Nula	Pobre TAM	
CYP2D6*4	1846G>A	rs3892097	Nula	Pobre TAM	
CYP2D6*5	CYP2D6del		Nula	Pobre TAM	(Karle <i>et al.</i> , 2013)
CYP2D6*6	1707delT	rs5030655	Reducida	Pobre TAM	
CYP2D6*7	2935A>C	rs5030867	No reporta	No reporta	(Luo <i>et al.</i> , 2005)
CYP2D6*8	1758G>T	rs5030865	Nula	Pobre TAM	
CYP2D6*9	2615-2617delAAG	rs5030656	Reducida	intermedio TAM	
CYP2D6*10	100C>T	rs1065852	Reducida	intermedio TAM	(Kiyotani <i>et al.</i> , 2008)
CYP2D6*12	124G>A	rs5030862	Inactiva	Pobre TAM	(Ruddy <i>et al.</i> , 2013)
CYP2D6*14	1758G>A	rs5030865	Nula	Pobre TAM	(Sakuyama <i>et al.</i> , 2008)
CYP2D6*17	1023C>T	rs28371706	Reducida	Intermedio TAM	(Marcucci <i>et al.</i> , 2002)
CYP2D6*29	1659G>A	rs61736512	Reducida	Intermedio TAM	(Karle <i>et al.</i> , 2013)
CYP2D6*35	31G>A; 2850C>T; 4180G>C	rs769258	Normal	Normal TAM	(Ruddy <i>et al.</i> , 2013)
CYP2D6*36	conversión del gen	rs1065852	Reducida	Intermedio TAM	(Sakuyama <i>et al.</i> , 2008)
CYP2D6*41	1661G>C; 2850C>T; 4140G>C	rs1058164	Reducida	Intermedio TAM	(Karle <i>et al.</i> , 2013)
CYP2D6*41	2988G>A	rs28371725	Reducida	Intermedio TAM	(Ruddy <i>et al.</i> , 2013)
CYP2D6*xN	CYP2D6dup		Incremento	Ultra rápido TAM.	
CYP2D6 y CYP2C19	CYP2D6*4 y CYP2C19*17		Incremento	Ultra rápido TAM	(Schrol <i>et al.</i> , 2007)
CYP2C9*2	430C>T	rs1799853	Reducida		(Murdter <i>et al.</i> , 2011)
CYP19A1	A/C	rs4646	Aumenta	Incrementa eficacia en tratamiento con letrozole.	(Colomer <i>et al.</i> , 2008)
CYP19	A/G	rs6493497 rs7176005	Actividad aromatasa	Incrementa actividad aromatase en tratamiento IA	(Park <i>et al.</i> , 2011)
CYP19A1	A/G	rs700518	Eficiencia	En pacientes con cáncer metastásico tratados con letrozol	
CYP19A1	G/T	rs10459592 T	Eficiencia	Mejora respuesta en pacientes tratados con letrozol	
CYP19A1	C/T	rs4775936	Eficiencia	Mayor beneficio clínico tomando letrozol	

Hormonoterapéuticos					
Alelos	Variante genética	SNP	Actividad Enzimática	Estado metabolizador	Referencia
CYP19A1	repeticiones TTTA	(repeticiones >7 TTTA)	Eficiencia	Menor riesgo de fracaso al consumir Letrozol	(Ferraldeschi <i>et al.</i> , 2012)
CYP19A1	C→T GLDN G > A	rs6493497 AG	Cambios en actividad aromatasa.	Aumenta eficiencia en tratamiento con Anastrozol, letrozol y exemestano.	(Straume <i>et al.</i> , 2012)
CYP19A1	GLDN	rs7176005 CC	Toxicidad	CC: Menor riesgo de síntomas vasomotores en posmenopausicas tratadas con exemestano. CT: Cambio en actividad aromatasa en tratamiento con anastrozole, letrozole y exemestano AA: riesgo de pérdida ósea asociada a IA	(Straume <i>et al.</i> , 2012) (Fontein <i>et al.</i> , 2014)
CYP19A1	A/G	rs934635 AA	Toxicidad	Eventos adversos musculo esqueléticos y síntomas vasomotores in posmenopausicas tratadas con exemestano.	(Fontein <i>et al.</i> , 2014)
CYP2C19*17	-3402C>T and-806C>T;	rs12248560	Metabolizador ultra rápido	Disminuye el riesgo de cáncer de seno en mujeres usando terapia hormonal por 10 años.	(Justenhoven, 2009)
CYP3A4*1B		rs2740574	No reporta	Consumo de tamoxifeno en presencia del alelo CYP3A4*1B puede aumentar el riesgo de desarrollar cáncer endometrial.	(Chu <i>et al.</i> , 2007)
SULT1A1*2	Arg213His	rs9282861	No reporta	La terapia hormonal, estrógeno más progestina (PE), se asocia con un mayor riesgo de cáncer de mama.	(Diergaard <i>et al.</i> , 2008)
ESR1	C>T	rs9322336 CC	Toxicidad	Incrementa el riesgo de toxicidad músculo esquelética al consumir exemestano	(Henry <i>et al.</i> , 2013)
ESR1	-351A>G	rs9340799 AA	Reducida	Pacientes posmenopáusica con genotipo AA que consumen TAM tienen disminución en el colesterol total, mientras que en premenopáusicas se evidencia disminución inducida en los triglicéridos y aumento de las lipoproteínas de alta densidad	(Ntukidem <i>et al.</i> , 2008)
ESR2	C > T	rs4986938 CC	Reducida	Genotipo CC en pacientes postmenopausicas incrementa los niveles de trigliceridos	
ABCB1	3435 A/G	rs1045642	Reducida	El genotipo AG en pacientes con cáncer de seno tienen un mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad durante el tratamiento con tamoxifeno	(Sensorn <i>et al.</i> , 2013)

Hormonoterapéuticos					
Alelos	Variante genética	SNP	Actividad Enzimática	Estado metabolizador	Referencia
TRAM2-AS1	C/T	rs6901146 CC	Toxicidad	Disminución del riesgo de fracturas óseas cuando se consume anastrozol, exemestano e inhibidores de aromatasas	(Liu et al., 2014)
TCL1A	C>G	rs11849538 CC	Toxicidad	Disminución de toxicidad Musculoesquelética tratamiento con exemestane	(Ingle et al., 2010)
TCL1A	A>G	rs2369049 GG	Toxicidad	Disminución de toxicidad Musculoesquelética tratamiento con exemestane	(Umamaheswaran et al., 2014)

Como se mencionó previamente las frecuencias alélicas de CYP2D6 varían entre poblaciones, muchas de las cuales están recopiladas en la base de datos "CYP2D6 allele nomenclature" pero algunas aún no han sido incluidas, por esta razón en la tabla 2 se indican las que se han reportado después del 9-Dec-2014 que no están incluidas en "CYP2D6 allele nomenclature". (PharmGKB CYP2D6 Allelic Variation Summary)

Por otra parte el tratamiento con quimioterapia en cáncer de seno incluye la combinación de diferentes medicamentos. Los protocolos basados en antraciclinas se han convertido en el estándar de quimioterapia adyuvante y neoadyuvante para la mayoría de pacientes, esto basados en las evidencias clínicas de eficacia en comparación con otros protocolos utilizados previamente (Hassan et al., 2010). Recientemente, taxanos, como docetaxel y paclitaxel, fueron incluidos en los protocolos basados en antraciclinas, mostrando reducción en el riesgo a recurrencia (De Laurentiis et al., 2008; Martin et al., 2010; Jacquin et al., 2012).

Quimioterapéuticos

Dentro de la clasificación de los quimioterapéuticos describiremos las características de los más usados: están los agentes alquilantes que tienen su efecto directamente sobre el ADN evitando la reproducción de las células cancerosas, no son específicos de la fase; en otras palabras, actúan en todas las fases del ciclo celular. Por ejemplo la ciclofosfamida (Cytoxan®), carboplatino y oxaliplatino.

Antimetabolitos, interfieren con el crecimiento del ADN y del ARN al sustituir la síntesis de purinas y pirimidinas. Estos agentes dañan las células durante la fase S. Por ejemplo 5-fluorouracilo (5-FU), metotrexato.

Antraciclinas son antibióticos contra el cáncer que interfieren con las topoisomerasas fundamentales en la replicación de ADN. Estos medicamentos ejercen su acción en todas las fases del ciclo celular. Por ejemplo Doxorubicina (Adriamycin®) y Epirubicina (Ellence®).

Inhibidores de la mitosis, son alcaloides de origen vegetal y otros compuestos derivados de productos na-

turales. Pueden detener la mitosis mediante su acción en los microtubulos. Son ejemplo Taxenos: paclitaxel (Taxol®) y docetaxel (Taxotere®).

Los protocolos de quimioterapia para cáncer de seno que se emplean actualmente son:

- CMF: ciclofosfamida , metotrexato, y 5-FU.
- CAF (o FAC): ciclofosfamida, doxorubicina y 5-FU.
- AC: doxorubicina y ciclofosfamida.
- EC: epirubicina y ciclofosfamida.
- TAC: docetaxel , doxorubicina y ciclofosfamida.
- AC → T: doxorubicina y ciclofosfamida seguida de paclitaxel o docetaxel.

Trastuzumab (Herceptin) se puede administrar con el paclitaxel o el docetaxel para tumores HER2/neu positivos.

- A → CMF: doxorubicina, seguida de CMF.
- CEF (FEC): ciclofosfamida, epirubicina y 5-FU (a esto le puede seguir docetaxel).
- TC: docetaxel y ciclofosfamida.
- TCH: docetaxel, carboplatino, y trastuzumab, para tumores HER2/neu positivos.

Algunos otros medicamentos de quimioterapia que se usan para tratar a pacientes con cáncer de seno incluyen cisplatino, vinorelbina (Navelbine®), capecitabina (Xeloda®), doxorubicina liposomal (Doxil®), gemcitabina (Gemzar®), mitoxantrona, exabepilona (Ixempra®), paclitaxel basado en albúmina (Abraxane®) y eribulina (Halaven®). Los medicamentos de terapia dirigida trastuzumab y lapatinib (Tykerb®) se pueden usar con estos medicamentos de quimioterapia para tumores que son HER2/neu positivos (Marsha S. y Liu G., 2009).

Las variantes genéticas asociadas a respuesta a quimioterapéuticos son diversas y varían entre poblaciones (tabla 3).

Tabla 2. Frecuencias alélicas para los haplotipos de CPY2D6 en diferentes poblaciones.

País	Población	n	Alelos/Frecuencia													Referencia		
			*1	*2	*3	*4	*5	*6	*9	*10	*17	*41	*1XN	*2XN	*4XN			
España	Caucásica	249	0.3313	0.1968		0.1661			0.0462	0.0281		0.0643						(De Dueñas et al., 2014)
Italia	Italiana	360			0.007	0.153	0.034	0.014						0.042				(Serpe et al., 2015)
EE. UU	Mezcla	218			0.05	0.25		0.084		0.69	0.069			0.32	0.05			(Langae et al., 2015)
Brasil	Mezcla	1020	0.389	0.215	0.07	0.94	4.6		0.011	0.205	0.056	0.055	0.0060	0.060	0.02			(Friedrich et al., 2014)
Costa Rica	Mezcla	385	0.48	0.149	0.006	0.158	0.042	0.003		0.009	0.040	0.034		0.017				(Céspedes-Gairó et al., 2014)
México	Mestizos Nativos: San Cristóbal (nCh), 110 Comunidades aborígenes (nCh) 102 Mestizos voluntarios sanos (mNL).	608					0											
		0.718	0.181	0.005	0.088	0.02	0	0.015	0.015	0.015	0.015	0.039						
			0.173	0.005	0.055	0.036	0	0.05	0.05	0	0	0.005						
		0.569	0.137	0.005	0.093	0.029	0.01		0.02	0	0.064	0.039						
República de Macedonia	Europeos	184	0.249	0.108	0.008	0.187		0	0.016	0.027		0.086	0.0059					(Nestorovska et al., 2014).
Roma	Europeos	426				0.225				0.266								
Hungría	Hungaros	431				0.181				0.205								(Weber et al., 2015)

Por otra parte, en la actualidad se encuentran test autorizados para ser practicados en mujeres con cáncer de seno; OncotypeDX®, MammaPrint®, AmpliChip CYP450®, Hercep Test™ y Endopredict®, (Rodríguez et

al., 2016) que ayudan a tomar decisiones con respecto a tratamiento, pero que para población nacional presentan un costo alto y no existe una validación en población colombiana que permita garantizar, costo efectividad total.

Tabla 3. Variantes genéticas asociadas a respuesta a quimioterapéuticos.

jaGen	SNP	Quimioterapéutico	Estado metabolizador	Referencia	n	Población	Efecto
ABCB1	rs1045642	Paclitaxel, taxanos	Toxicidad.	(Lal et al., 2008)	62	Pacientes cáncer de seno asiáticas	El aumento de los niveles de exposición y la reducción del aclaramiento.
	rs1128503						
	rs2032582						
ABCB1	rs2032582	5-fluorouracilo, epirrubicina y ciclofosfamida y docetaxel	Proteína transportadora.	(Vulsteke, et al., 2014)	991	Pacientes cáncer de seno	Mayor supervivencia específica de cáncer de mama.
ABCB1	rs1045642 GG	Quimioterapia neoadjuvante basada en 5-fluorouracilo y ciclofosfamida	Toxicidad	(Henríquez-Hernández et al., 2010)	50	Cáncer de seno primario	Asociada con toxicidad debida a la quimioterapia con 5-fluorouracilo
CYP2C8	rs10509681	Paclitaxel	Toxicidad	(Dai, et al., 2001)	82	pacientes con cáncer	Disminuye el metabolismo del paclitaxel y el ácido araquidónico
					170	afroamericanos y caucásicos	
CYP1B1	rs1056836 GG	docetaxel	Sobrevida	(Lee, et al., 2014)	324	Pacientes cáncer de seno metastásico	Aumenta supervivencia libre de progresión
		paclitaxel					
		taxanos					
CYP3A4*1	rs2740574	Ciclofosfamida	Toxicidad	(Su et al., 2010)	127	Pacientes jóvenes con cáncer de mama	Insuficiencia ovárica después de quimioterapia a base de ciclofosfamida
CYP3A5*3	6986A>G rs776746	Paclitaxel	Neurotoxicidad	(Leskelä et al., 2010)	118	Mujeres españolas con cáncer de seno tratadas con paclitaxel	Reduce eventos de neurotoxicidad
CYP2C19*2	681G>A	Ciclofosfamida, doxorubicina	Toxicidad	(Bray et al., 2010)	230	Pacientes cáncer de seno	Aumenta toxicidad
	rs4244285						
CYP1A1	rs1048943	Docetaxel	Sobrevida	(Dong, et al., 2012)	69	Cáncer de seno Metastásico	marcador pronóstico de supervivencia
CBR3	rs1056892	Doxorrubicina	Toxicidad	(Fan et al., 2008)	101	Cáncer de seno	variabilidad interindividual e interétnica de la farmacocinética y la farmacodinámica de doxorubicina

jaGen	SNP	Quimioterapéutico	Estado metabolizador	Referencia	n	Población	Efecto
FGD4	rs10771973	Paclitaxel	Toxicidad	(Baldwin <i>et al.</i> , 2012)	855	Cáncer de seno Primario	neuropatía periférica sensorial inducida por paclitaxel
GSTM1	GSTM1 null	Cisplatino	Respuesta	(Oliveira <i>et al.</i> , 2010)		Mujeres con adenocarcinoma ductal invasivo de seno	Mejor respuesta a Cisplatino
TYMs	rs16430-1494delTTAAAG	5-Fluorouracilo	Riesgo	(Guan <i>et al.</i> , 2015)		Cáncer de seno	Contribuye a cáncer de seno esporádico en mujeres hispanas ≤ 55 años.
Metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR)	c.677C>T/C667T c.1298A>C/A1298C	5-Fluorouracilo	Reduce actividad de MTHFR	(Loganayagam <i>et al.</i> , 2013)	430	Cáncer de seno	Toxicidad en terapia con fluoropirimidina
SLC29A1	rs747199 CC	Gemcitabina, paclitaxel	Respuesta	(Lee <i>et al.</i> , 2014)	324	Cáncer de seno Metastásico	Eficacia-Aumento en la respuesta

Conclusiones

La variabilidad humana hace necesario caracterizar cada población, para obtener la descripción de los polimorfismos genéticos asociadas con diferentes desenlaces, en farmacogenética conocer la frecuencia de variantes propias de población colombiana en diversas enzimas asociadas a respuesta a medicamentos usados en el tratamiento de cáncer de seno permitirá identificar patrones para prescribir un tratamiento que realmente pueda ser asimilado, evitando de este modo la presentación de efectos adversos ocasionados por toxicidad fuera del blanco y en aquellos que se identifique un genotipo pobre metabolizador se podrán implementar ajustes de dosis u otros esquemas de tratamiento. Teniendo en cuenta que el tamoxifeno es el hormono terapéutico de primera elección, se hace necesario evaluar los polimorfismos presentes en *CYP2D6*, para realizar la categorización de las pacientes en metabolizadoras lentas, intermedias o ultra rápidas. Una vez identificado su fenotipo se podrá prescribir el tratamiento adecuado.

Una vez identificadas las variantes genéticas frecuentes en población colombiana, esta información permitirán generar "kits en casa" que incluyan las variantes clínicas más relevantes y frecuentes, a un costo más accesible que permita realizar un tamizaje previo a suministrar un determinado tratamiento, generando la posibilidad de efectuar direccionamiento terapéutico. Se requiere caracterizar nuestra población pues solo cuando conozcamos las particularidades de nuestra población podremos generar soluciones a medida que nos acercaran a una medicina de precisión.

Referencias bibliográficas

- Baldwin, R. M., Owzar, K., Zembutsu, H., Chhibber, A., Kubo, M., Jiang, C., ... & Friedman, P. N. (2012). A genome-wide association study identifies novel loci for paclitaxel-induced sensory peripheral neuropathy in CALGB 40101. *Clinical Cancer Research*, 18(18), 5099-5109.
- Bray, J., Sludden, J., Griffin, M. J., Cole, M., Verrill, M., Jamieson, D., & Boddy, A. V. (2010). Influence of pharmacogenetics on response and toxicity in breast cancer patients treated with doxorubicin and cyclophosphamide. *British journal of cancer*, 102(6), 1003-1009.
- Cabrera Morales, C. Morales, C. (2005). Estudio comparativo de la amplificación de Her2/neu mediante FISH y PCR cuantitativa en tiempo real en tumores de mama. *Oncología (Barcelona)*, 28(10), 26-30.
- Carpenter, R., & Miller, W. R. (2005). Role of aromatase inhibitors in breast cancer. *British Journal of Cancer*, 93, S1-S5.
- Céspedes-Garro, C., Jiménez-Arce, G., G Naranjo, M. E., Barrantes, R., & Llerena, A. (2014). Ethnic background and CYP2D6 genetic polymorphisms in Costa Ricans. *Revista de Biología Tropical*, 62(4), 1659-1671.
- Chicaíza, L., García, M., & Gamboa, O. (2008). Tamoxifén vs inhibidores de aromatasa para cáncer de mama: análisis de costo efectividad para Colombia. Bogotá: *Facultad de Ciencias Económicas*, Universidad Nacional de Colombia.
- Colomer, R., Monzo, M., Tusquets, I., Rifa, J., Baena, J. M., Barnadas, A., ... & Llombart, A. (2008). A single-nucleotide polymorphism in the aromatase gene is associated with the efficacy of the aromatase inhibitor letrozole in advanced breast carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 14(3), 811-816.
- CYP2D6 allele nomenclature. (2014). CYP2D6 allele nomenclature. Recuperado de <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>. The

- Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee Web Site.
- Dai, D., Zeldin, D. C., Blaisdell, J. A., Chanas, B., Coulter, S. J., Ghannayem, B. I., & Goldstein, J. A. (2001). Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics and Genomics*, *11*(7), 597-607.
- De Dueñas, E. M., Aranda, E. O., Lopez-Barajas, I. B., Magdalena, T. F., Moya, F. B., García, L. M. C., ... & Albiach, C. F. (2014). Adjusting the dose of tamoxifen in patients with early breast cancer and CYP2D6 poor metabolizer phenotype. *The Breast*, *23*(4), 400-406.
- De Laurentiis, M., Canello, G., D'Agostino, D., Giuliano, M., Giordano, A., Montagna, E., ... & Pennacchio, R. (2008). Taxane-based combinations as adjuvant chemotherapy of early breast cancer: a meta-analysis of randomized trials. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(1), 44-53.
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., ... & Narod, S. A. (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*, *13*(15), 4429-4434.
- De Vita, V. T., Rosenberg, S. A., & Hellman, S. (1984). *Cáncer: principios y práctica de Oncología*. Salvat editores.
- Desta, Z., Ward, B. A., Soukhova, N. V., & Flockhart, D. A. (2004). Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *310*(3), 1062-1075.
- Diergaarde, B., Potter, J. D., Jupe, E. R., Manjeshwar, S., Shimasaki, C. D., Pugh, T. W., ... & White, E. (2008). Polymorphisms in genes involved in sex hormone metabolism, estrogen plus progestin hormone therapy use, and risk of postmenopausal breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *17*(7), 1751-1759.
- Dong, N., Yu, J., Wang, C., Zheng, X., Wang, Z., Di, L., ... & Jiang, H. (2012). Pharmacogenetic assessment of clinical outcome in patients with metastatic breast cancer treated with docetaxel plus capecitabine. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *138*(7), 1197-1203.
- Eccles, S. A., Aboagye, E. O., Ali, S., Anderson, A. S., Armes, J., Berditchevski, F., ... & Bundred, N. J. (2013). Critical research gaps and translational priorities for the successful prevention and treatment of breast cancer. *Breast Cancer Research*, *15*(5), 1-37.
- Fan, L., Goh, B. C., Wong, C. I., Sukri, N., Lim, S. E., Tan, S. H., ... & lau, P. (2008). Genotype of human carbonyl reductase CBR3 correlates with doxorubicin disposition and toxicity. *Pharmacogenetics and Genomics*, *18*(7), 623-631.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, *136*(5), E359-E386.
- Ferraldeschi, R., Arnedos, M., Hadfield, K. D., A'Hern, R., Drury, S., Wardley, A., ... & Newman, W. G. (2012). Polymorphisms of CYP19A1 and response to aromatase inhibitors in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, *133*(3), 1191-1198.
- Fontein, D. B., Houtsma, D., Nortier, J. W., Baak-Pablo, R. F., Kranenburg, E. M. K., van der Straaten, T. R., ... & Guchelaar, H. J. (2014). Germline variants in the CYP19A1 gene are related to specific adverse events in aromatase inhibitor users: a substudy of Dutch patients in the TEAM trial. *Breast Cancer Research and Treatment*, *144*(3), 599-606.
- Friedrich, D. C., Genro, J. P., Sortica, V. A., Suarez-Kurtz, G., de Moraes, M. E., Pena, S. D., ... & Hutz, M. H. (2014). Distribution of CYP2D6 alleles and phenotypes in the Brazilian population. *PLoS one*, *9*(10), e110691.
- Furth, J. (1975). A comprehensive treatise, ed. Becker GF. *Plenum New York*, *1*, 75-120.
- GLOBOCAN. (2012). Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2012. Consultado el 11 de marzo de 2016, pagina web de International Agency for Research on cancer, World Health Organization, recuperado de: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/breast.asp>
- Goetz, M. P., Rae, J. M., Suman, V. J., Sařgren, S. L., Ames, M. M., Visscher, D. W., ... & Desta, Z. (2005). Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *Journal of Clinical Oncology*, *23*(36), 9312-9318.
- Guan, X., Liu, H., Ju, J., Li, Y., Li, P., Wang, L. E., ... & Liu, Z. (2015). Genetic variant rs16430 6bp> 0bp at the microRNA-binding site in TYMS and risk of sporadic breast cancer risk in non-hispanic white women aged ≤ 55 years. *Molecular carcinogenesis*, *54*(4), 281-290.
- Gurrola, S. B., Guevara, E. J. T., & Ramírez, H. J. C. (2010). Farmacogenética y farmacogenómica: hacia una medicina personalizada. *Rev Fac Med UNAM*, *53*(2).
- Hassan, M. S. U., Ansari, J., Spooner, D., & Hussain, S. A. (2010). Chemotherapy for breast cancer (Review). *Oncology reports*, *24*(5), 1121-1131.
- Henrıquez-Hernández, L. A., Murias-Rosales, A., González-Hernández, A., de León, A. C., Díaz-Chico, N., & Fernández-Pérez, L. (2010). Distribution of TYMS, MTHFR, p53 and MDR1 gene polymorphisms in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer epidemiology*, *34*(5), 634-638.
- Henry, N. L., Skaar, T. C., Dantzer, J., Li, L., Kidwell, K., Gersch, C., ... & Philips, S. (2013). Genetic associations with toxicity-related discontinuation of aromatase inhibitor therapy for breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, *138*(3), 807-816.
- Hewett, M., Oliver, D. E., Rubin, D. L., Easton, K. L., Stuart, J. M., Altman, R. B., & Klein, T. E. (2002). PharmGKB: the pharmacogenetics knowledge base. *Nucleic acids research*, *30*(1), 163-165.
- Higgins, M. J., Rae, J. M., Flockhart, D. A., Hayes, D. F., & Stearns, V. (2009). Pharmacogenetics of tamoxifen: who should undergo CYP2D6 genetic testing?. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, *7*(2), 203-213.
- Instituto Nacional de Cancerología ESE (2013). Ministerio de Salud y Protección Social, Colciencias, Instituto Nacional de Cancerología ESE-FedesaLud. Guía de Práctica Clínica para la detección temprana, tratamiento integral, seguimiento y rehabilitación de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama. Versión completa, Colombia, 2013. Recuperado de http://gpc.minsalud.gov.co/Documents/Guias-PDF-Recursos/Mama/GPC_Prof_Sal_Mama.pdf
- Jacquin, J. P., Jones, S., Magné, N., Chapelle, C., Ellis, P., Janni, W., ... & Laporte, S. (2012). Docetaxel-containing adjuvant chemothe-

- rapy in patients with early stage breast cancer. Consistency of effect independent of nodal and biomarker status: a meta-analysis of 14 randomized clinical trials. *Breast Cancer Research and Treatment*, 134(3), 903-913.
- Justenhoven, C., Hamann, U., Pierl, C. B., Baisch, C., Harth, V., Rabstein, S., ... & Ko, Y. D. (2009). CYP2C19* 17 is associated with decreased breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment*, 115(2), 391-396.
- Karle, J., Bolbrinker, J., Vogl, S., Kreutz, R., Denkert, C., Eucker, J., ... & Regierer, A. C. (2013). Influence of CYP2D6-genotype on tamoxifen efficacy in advanced breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 139(2), 553-560.
- Kiyotani, K., Mushiroda, T., Imamura, C. K., Tanigawara, Y., Hosono, N., Kubo, M., ... & Zembutsu, H. (2012). Dose-adjustment study of tamoxifen based on CYP2D6 genotypes in Japanese breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 131(1), 137-145.
- Kiyotani, K., Mushiroda, T., Sasa, M., Bando, Y., Sumitomo, I., Hosono, N., ... & Zembutsu, H. (2008). Impact of CYP2D6* 10 on recurrence-free survival in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy. *Cancer Science*, 99(5), 995-999.
- Lacroix, M., & Leclercq, G. (2004). About GATA3, HNF3A, and XBP1, three genes co-expressed with the oestrogen receptor- α gene (ESR1) in breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 219(1), 1-7.
- Lal, S., Wong, Z. W., Sandanaraj, E., Xiang, X., Ang, P. C. S., Lee, E. J., & Chowbay, B. (2008). Influence of ABCB1 and ABCG2 polymorphisms on doxorubicin disposition in Asian breast cancer patients. *Cancer Science*, 99(4), 816-823.
- Lee, A., Shi, Q., Pavey, E. S., Sargent, D. J., Alberts, S. R., Sinicrope, F. A., ... & Diasio, R. B. (2013, May). Validation of DPYD variants DPYD* 2A, I560S, and D949V as predictors of 5-fluorouracil (5-FU)-related toxicity in stage III colon cancer (CC) patients from adjuvant trial NCCTG N0147. In *ASCO Annual Meeting Proceedings*, 31(15) 3510.
- Lee, S. Y., Im, S. A., Park, Y. H., Woo, S. Y., Kim, S., Choi, M. K., ... & Im, Y. H. (2014). Genetic polymorphisms of SLC28A3, SLC29A1 and RRM1 predict clinical outcome in patients with metastatic breast cancer receiving gemcitabine plus paclitaxel chemotherapy. *European Journal of Cancer*, 50(4), 698-705.
- Leskelä, S., Jara, C., Leandro-García, L. J., Martínez, A., García-Donas, J., Hernando, S., ... & López-Jiménez, E. (2011). Polymorphisms in cytochromes P450 2C8 and 3A5 are associated with paclitaxel neurotoxicity. *The pharmacogenomics journal*, 11(2), 121-129.
- Liu, M., Goss, P. E., Ingle, J. N., Kubo, M., Furukawa, Y., Batzler, A., ... & Chapman, J. A. W. (2014). Aromatase inhibitor-associated bone fractures: a case-cohort GWAS and functional genomics. *Molecular Endocrinology*, 28(10), 1740-1751.
- Loganayagam, A., Hernandez, M. A., Corrigan, A., Fairbanks, L., Lewis, C. M., Harper, P., ... & Marinaki, A. M. (2013). Pharmacogenetic variants in the DPYD, TYMS, CDA and MTHFR genes are clinically significant predictors of fluoropyrimidine toxicity. *British journal of cancer*, 108(12), 2505-2515.
- Marcucci, K. A., Pearce, R. E., Crespi, C., Steimel, D. T., Leeder, J. S., & Gaedigk, A. (2002). Characterization of cytochrome P450 2D6. 1 (CYP2D6. 1), CYP2D6. 2, and CYP2D6. 17 activities toward model CYP2D6 substrates dextromethorphan, bufuralol, and debrisoquine. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(5), 595-601.
- Marsh, S., & Liu, G. (2009). Pharmacokinetics and pharmacogenomics in breast cancer chemotherapy. *Advanced drug delivery reviews*, 61(5), 381-387.
- McCafferty, M. P., Healy, N. A., & Kerin, M. J. (2009). Breast cancer subtypes and molecular biomarkers. *Diagnostic Histopathology*, 15(10), 485-489.
- Mürdter, T. E., Schroth, W., Bacchus-Gerybadze, L., Winter, S., Heinkele, G., Simon, W., ... & Brauch, H. (2011). Activity levels of tamoxifen metabolites at the estrogen receptor and the impact of genetic polymorphisms of phase I and II enzymes on their concentration levels in plasma. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 89(5), 708-717.
- Muroi, Y., Saito, T., Takahashi, M., Sakuyama, K., Niinuma, Y., Ito, M., ... & Hirasawa, N. (2014). Functional characterization of wild-type and 49 CYP2D6 allelic variants for N-desmethyltamoxifen 4-hydroxylation activity. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 29(5), 360-366.
- Nestorovska, K. A., Jakovski, K., Naumovska, Z., Bajro, H. M., Sterjev, Z., Eftimov, A., ... & Dimovski, A. J. (2014). Distribution of the Most Common Genetic Variants Associated with a Variable Drug Response in the Population of the Republic of Macedonia. *Balkan Journal of Medical Genetics*, 17(2), 5-14.
- Ntukidem, N. I., Nguyen, A. T., Stearns, V., Rehman, M., Schott, A., Skaar, T., ... & Hayden, J. (2008). Estrogen receptor genotypes, menopausal status, and the lipid effects of tamoxifen. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 83(5), 702-710.
- Park, I. H., Lee, Y. S., Lee, K. S., Kim, S. Y., Hong, S. H., Jeong, J., ... & Nam, B. H. (2011). Single nucleotide polymorphisms of CYP19A1 predict clinical outcomes and adverse events associated with letrozole in patients with metastatic breast cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 68(5), 1263-1271.
- Perou, C. M., Sørli, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., ... & Fluge, Ø. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747-752.
- Sakuyama, K., Sasaki, T., Ujii, S., Obata, K., Mizugaki, M., Ishikawa, M., & Hiratsuka, M. (2008). Functional Characterization of 17 CYP2D6 Allelic Variants (CYP2D6. 2, 10, 14A-B, 18, 27, 36, 39, 47-51, 53-55, and 57). *Drug Metabolism and Disposition*, 36(12), 2460-2467.
- Sánchez-Muñoz, A., García-Tapiador, A. M., Martínez-Ortega, E., Dueñas-García, R., Jaén-Morago, A., Ortega-Granados, A. L., ... & Morales, F. (2008). Tumour molecular subtyping according to hormone receptors and HER2 status defines different pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer. *Clinical and Translational Oncology*, 10(10), 646-653.
- Sensorn, I., Sirachainan, E., Chamnanphon, M., Pasomsub, E., Trachu, N., Supavilai, P., ... & Pinthong, D. (2013). Association of CYP3A4/5, ABCB1 and ABCC2 polymorphisms and clinical outcomes of Thai breast cancer patients treated with tamoxifen. *Pharmacogenomics and personalized medicine*, 6, 93.
- Serpe, L., Canaparo, R., Scordo, M. G., & Spina, E. (2015). Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes in Italian populations. *Drug metabolism and personalized therapy*, 30(2), 107-120.
- Singletary, S. E., Allred, C., Ashley, P., Bassett, L. W., Berry, D., Bland, K. I., ... & Hughes, L. L. (2002). Revision of the American Joint

- Committee on Cancer staging system for breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 20(17), 3628-3636.
- Sotiriou, C., Neo, S. Y., McShane, L. M., Korn, E. L., Long, P. M., Jazaeri, A., ... & Liu, E. T. (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(18), 10393-10398.
- Straume, A. H., Knappskog, S., & Lønning, P. E. (2012). Effect of CYP19 rs6493497 and rs7176005 haplotype status on in vivo aromatase transcription, plasma and tissue estrogen levels in postmenopausal women. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 128(1), 69-75.
- Su, H. I., Sammel, M. D., Velders, L., Horn, M., Stankiewicz, C., Matro, J., ... & DeMichele, A. (2010). Association of cyclophosphamide drug-metabolizing enzyme polymorphisms and chemotherapy-related ovarian failure in breast cancer survivors. *Fertility and sterility*, 94(2), 645-654.
- Oliveira, A. L., Rodrigues, F. F., Santos, R. E., Aoki, T., Rocha, M. N., Longui, C. A., & Melo, M. B. (2010). GSTT1, GSTM1, and GSTP1 polymorphisms and chemotherapy response in locally advanced breast cancer. *Genet Mol Res*, 9(2), 1045-1053.
- Pathiraja, T. N., Stearns, V., & Oesterreich, S. (2010). Epigenetic regulation in estrogen receptor positive breast cancer—role in treatment response. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 15(1), 35-47.
- Pharmgkb Pharmacogenomics. Knowledge. Implementation. (2016). Recuperado de: <https://www.pharmgkb.org/guideline/PA166104966>.
- Piccart-Gebhart, M. J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., ... & Cameron, D. (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 353(16), 1659-1672.
- Piñeros Petersen, M., Hernández Suárez, G., & Murillo Moreno, R. (2003). *Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia*. Instituto Nacional de Cancerología; Instituto Geográfico Agustín Codazzi.
- Rodríguez-Antona, C., & Ingelman-Sundberg, M. (2006). Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene*, 25(11), 1679-1691.
- Rodríguez-Vicente, A. E., Lumbreras, E., Hernández, J. M., Martín, M., Calles, A., Otín, C. L., ... & Taron, M. (2016). Pharmacogenetics and pharmacogenomics as tools in cancer therapy. *Drug metabolism and personalized therapy*, 31(1), 25-34.
- Rosenberg, S. A. (2000). Principios de tratamiento del cáncer: cirugía oncológica. *Cáncer. Principios y Práctica de Oncología*. 5ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana, SA y Arán Ediciones, SA, 295-306.
- Ruddy, K. J., Desantis, S. D., Gelman, R. S., Wu, A. H., Punglia, R. S., Mayer, E. L., ... & Burstein, H. J. (2013). Personalized medicine in breast cancer: tamoxifen, endoxifen, and CYP2D6 in clinical practice. *Breast cancer research and treatment*, 141(3), 421-427.
- Saladores, P. H., Precht, J. C., Schroth, W., Brauch, H., & Schwab, M. (2013). Impact of metabolizing enzymes on drug response of endocrine therapy in breast cancer. *Expert review of molecular diagnostics*, 13(4), 349-365.
- Schroth, W., Antoniadou, L., Fritz, P., Schwab, M., Muerdter, T., Zanger, U. M., ... & Brauch, H. (2007). Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. *Journal of Clinical Oncology*, 25(33), 5187-5193.
- Stoll, B. A. (1969). *Hormonal management in breast cancer*. Lippincott.
- Umamaheswaran, G., Dkhar, S. A., Kumar, A. S. A., Srinivasa, R. K., Kadambari, D., & Adithan, C. (2014). Genotype, allele and haplotype frequencies of four TCL1A gene polymorphisms associated with musculoskeletal toxicity in the South Indian descent. *BiolImpacts: BI*, 4(2), 95.
- Van't Veer, L. J., Dai, H., Van De Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., ... & Schreiber, G. J. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415(6871), 530-536.
- Vulsteke, C., Pfeil, A. M., Schwenkglens, M., Pettengell, R., Szucs, T. D., Lambrechts, D., ... & Neven, P. (2014). Impact of genetic variability and treatment-related factors on outcome in early breast cancer patients receiving (neo-) adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide, and docetaxel. *Breast cancer research and treatment*, 147(3), 557-570.
- Weber, A., Szalai, R., Sipeky, C., Magyari, L., Melegh, M., Jaromi, L., ... & Melegh, B. (2015). Increased prevalence of functional minor allele variants of drug metabolizing CYP2B6 and CYP2D6 genes in Roma population samples. *Pharmacological Reports*, 67(3), 460-464.
- Whirl-Carrillo, M., McDonagh, E. M., Hebert, J. M., Gong, L., Sangkuhl, K., Thorn, C. F., ... & Klein, T. E. (2012). Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 92(4), 414.

Procedimientos actuales para la extracción y purificación de flavonoides cítricos

Current procedures for extraction and purification of citrus flavonoides

Andrés Alejandro Damián-Reyna^{}, Juan Carlos González-Hernández^{**},
Ma. del Carmen Chávez-Parga^{*,***}*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57724

Resumen

En la industria alimenticia, los agentes microbicidas son usados para preservar la calidad y seguridad de los alimentos procesados. Los flavonoides encontrados en extractos cítricos han mostrado capacidad de inhibición del crecimiento celular de un gran grupo de microorganismos infecciosos, por lo tanto, éstos compuestos pueden ser útiles como agentes antivirales, antifúngicos y antibacteriales. Los flavonoides que se pueden encontrar principalmente en varias de las especies cítricas son hesperetina, hesperidina, luteolina, naringenina, naringina, narirutina, neohesperidina, nobiletina y tangeretina. A continuación se resumen los procesos utilizados recientemente para extraer, purificar y analizar los flavonoides principales en frutas cítricas.

Ya optimizado el medio de cultivo se procedió a realizar una cinética confirmatoria con base a las condiciones encontradas pero evaluando el crecimiento celular por conteo en cámara de Neubauer y la producción de etanol mediante método enzimático (Procedimiento de ensayo K-ETOH, Megazyme) para confirmar los valores.

Palabras clave: flavonoides, polifenoles, purificación, cítricos, microbicida.

Abstract

In the food industry, antimicrobial agents are used for preserving the quality and safety of processed food. Flavonoids found in citrus extracts inhibit cell growth of a large group of infectious microorganisms, therefore, these compounds may be useful as antiviral, antifungal and antibacterial agents. Hesperetin, hesperidin, luteolin, naringenin, naringin, narirutin, neohesperidin, nobletin and tangeretin are some of the main flavonoids found in various citrus fruits. The processes used in recent years to extract, purify and analyze typical flavonoids from citrus species are reviewed.

Key words: flavonoids, polyphenol, purification, citrus, antimicrobial.

Recibido: agosto 10 de 2015

Aprobado: abril 25 de 2016

Introduction

Flavonoids are a group of polyphenols that are found in fruit, vegetables, nuts, seeds, stems and flowers as well as tea, wine, propolis and honey (Tham & Liew,

2014). Some flavonoids are responsible for fruit coloration. Most of flavonoids are structured basically by 3 rings, two of them are aromatic benzene rings (called rings A and B), connected by an oxygen pyrane ring (called ring C), as shown in figure 1, and there is the

* Facultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Francisco J. Mújica S/N, Col. Felicitas del Río, 58030, Morelia, Michoacán, México. Correo electrónico: pandamian77@hotmail.com.

** Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Ing. Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia, Av. Tecnológico # 1500, Colonia Lomas de Santiaguito, 58120, Morelia, Michoacán, México. Correo electrónico: jcgh1974@yahoo.com.

*** Correo electrónico: cparga@umich.mx

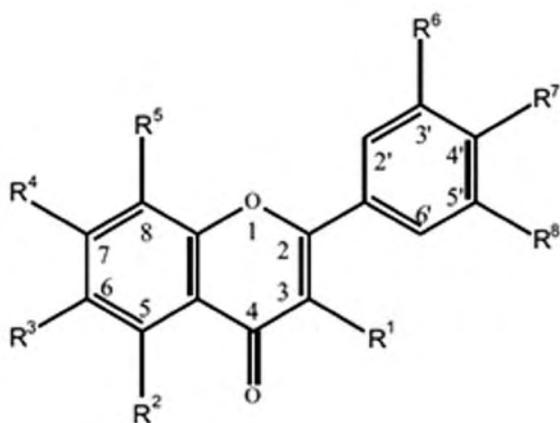


Figure 1. Flavonoids general structure.

characteristic presence of hydroxyl groups in one or more R positions.

Especially abundant in citrus fruits, there are some flavonoids that can be found in almost all citrus fruits (table 1), like hesperidin, which consolidate a group called citrus flavonoids. Their concentration in peels is higher than in juice and seeds (Codoñer & Valls, 2010) as a result of flavonoids role for fruit coloration.

Citrus flavonoids are well known for their antioxidant (Asikin *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2014; Barreca *et al.*, 2011a; Barreca *et al.*, 2011b; Pekal *et al.*, 2011; Procházková *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2011; Kelebek, 2010) antifungal (Buer *et al.*, 2010; Montes, 2009), and antimicrobial effect (Celiz & Audisio, 2011; Cushnie & Lamb, 2011;

Vikram *et al.*, 2010), and even for accelerating wound and disease healing (Wang *et al.*, 2014; Arab & Liebeskind, 2010; Codoñer & Valls, 2010; Neves *et al.*, 2010).

For nourishment purposes, research has concluded that consumers in theory are ready to accept food rich in flavonoids, by informing them about the scientific benefits (Zang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014a; Jung *et al.*, 2011; Lampila *et al.*, 2009). In Europe, an average adult person spends up to €454.7 per year in flavonoids contained in cardiovascular drugs (Sanfelix *et al.*, 2010).

Raw materials

Citrus fruits contain a range of key nutrients such as vitamin C, folate, dietary fiber, minerals and phytochemicals, which attributes to their health-promoting properties (Ledesma & Luque, 2014). It is believed that vitamin C is a major contributor to the anti-oxidant capacity of citrus. However, the major contribution of citrus anti-oxidant activity comes from the combination of phytochemicals and from their synergistic action with vitamin C. The major phytochemicals in citrus fruits are the terpenes and phenolic compounds, which possess anti-inflammatory and anti-carcinogenic activity (Wang *et al.*, 2014; Natarajan *et al.*, 2011; Codoñer & Valls, 2010).

The main citrus fruits in flavonoids research have been orange (*C. sinensis*), lemon (*C. limon*), grapefruit (*C. paradisi*) and tangerine (*C. reticulata*), for at least the past 30 years. Nowadays, native varieties are of special

Table 1. Substitution in the general structure for some of the main citrus flavonoids (Barreca *et al.*, 2011a; Gonzalez *et al.*, 2010)

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸
Flavanones								
Hesperidin	H	OH	H	O-rut	H	OH	OCH ₃	H
Naringin	H	OH	H	O-nh	H	H	OH	H
Neohesperidin	H	OH	H	O-nh	H	OH	OCH ₃	H
Narirutin	H	OH	H	O-rut	H	H	OH	H
Flavones								
Hesperetin	H	OH	H	OH	H	OH	OCH ₃	H
Naringenin	H	OH	H	OH	H	H	OH	H
Flavone Aglycon								
Luteolin	H	OH	H	OH	H	OH	OH	H
Polymethoxyflavones								
Nobiletin	H	OCH ₃	H					
Tangeretin	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	H

rut: rutinose; *nh:* neohesperidose.

interest. Tough *Citrus* species are harvested all around the world (Lorente *et al.*, 2014), some species are better developed than others, depending on climate conditions, and its availability varies from one country to another or even regions within the same country (Roussos, 2011). This influences the research on specific *Citrus* species (table 2), where the main citrus producing countries have more studies on a wider variety

of species, exploring even the wild varieties found in unique locations.

Raw material conditioning

Citrus have been collected and extracted in early springtime or late winter (Sandoval *et al.*, 2012; Barreca *et al.*, 2010), and about 2-5 months after the flowering

Table 2. Citrus species used in recent flavonoid research.

Citrus species	Country	References	Citrus species	Country	References
<i>C. aurantifolia</i>	Italy	Costa <i>et al.</i> , 2014	<i>C. paradisi</i>	China	Xi <i>et al.</i> , 2014a
		Loizzo <i>et al.</i> , 2013			Sun <i>et al.</i> , 2013
	Spain	Guimaraes <i>et al.</i> , 2010			Zhang <i>et al.</i> , 2011
<i>C. aurantium</i>	Algeria	Lagha & Madani, 2013		Spain	Abad <i>et al.</i> , 2014
	China	Sun <i>et al.</i> , 2013			Guimaraes <i>et al.</i> , 2010
	Italy	Barreca <i>et al.</i> , 2011a		Turkey	Kelebek, 2010
	Tunisia	Moulehi <i>et al.</i> , 2012	<i>C. poonensis</i>	China	Xi <i>et al.</i> , 2014b
<i>C. bergamia</i>	Italy	DiDonna <i>et al.</i> , 2011			Sun <i>et al.</i> , 2013
	Mauritius	Ramful <i>et al.</i> , 2011			Ye <i>et al.</i> , 2011
<i>C. clementina</i>	China	Xi <i>et al.</i> , 2014b	<i>C. reticulata</i>	China	Xi <i>et al.</i> , 2014b
	Colombia	Alvarez <i>et al.</i> , 2012			Zhang <i>et al.</i> , 2014c
<i>C. daoianensis</i>	Mauritius	Ramful <i>et al.</i> , 2011		Colombia	Londoño <i>et al.</i> , 2010
<i>C. erythrosa</i>	China	Ye <i>et al.</i> , 2011		Croatia	Levaj <i>et al.</i> , 2008
<i>C. grandis</i>	China	Duan <i>et al.</i> , 2014		Italy	Barreca <i>et al.</i> , 2013
		Li <i>et al.</i> , 2014		Mauritius	Ramful <i>et al.</i> , 2011
		Xi <i>et al.</i> , 2014		Slovenia	Makovsek <i>et al.</i> , 2012
		Zhang <i>et al.</i> , 2014b		Spain	Abad <i>et al.</i> , 2014
		Sun <i>et al.</i> , 2013		Tunisia	Moulehi <i>et al.</i> , 2012
		Zhang <i>et al.</i> , 2011		Turkey	Kelebek & Selli, 2014
<i>C. jambhiri</i>	South Korea	Yoo <i>et al.</i> , 2009	<i>C. sinensis</i>	Algeria	Lagha & Madani, 2013
	Egypt	Hamdan <i>et al.</i> , 2011		China	Pan <i>et al.</i> , 2014
	South Korea	Yoo <i>et al.</i> , 2009			Sun <i>et al.</i> , 2013
<i>C. junos</i>	South Korea	Yoo <i>et al.</i> , 2009			Sun <i>et al.</i> , 2013
<i>C. latifolia</i>	Colombia	Londoño <i>et al.</i> , 2010		Colombia	Londoño <i>et al.</i> , 2010
<i>C. limetta</i>	México	Rodriguez <i>et al.</i> , 2014		Mauritius	Ramful <i>et al.</i> , 2011
	Italy	Barreca <i>et al.</i> , 2011c		Italy	Barreca <i>et al.</i> , 2014
<i>C. limon</i>	China	Sun <i>et al.</i> , 2013		Spain	Abad <i>et al.</i> , 2014
	Spain	Abad <i>et al.</i> , 2014			Andreu <i>et al.</i> , 2010
		Gonzalez <i>et al.</i> , 2010			Guimaraes <i>et al.</i> , 2010
		Guimaraes <i>et al.</i> , 2010		Taiwan	Chen <i>et al.</i> , 2011
<i>C. maxima</i>	Mauritius	Ramful <i>et al.</i> , 2011	<i>C. succosa</i>	China	Ye <i>et al.</i> , 2011
<i>C. medica</i>	Italy	Menichini <i>et al.</i> , 2011a	<i>C. suavisissima</i>	China	Ye <i>et al.</i> , 2011
		Menichini <i>et al.</i> , 2011b	<i>C. tardiferax</i>	China	Ye <i>et al.</i> , 2011
<i>C. meyeri</i>	Mauritius	Ramful <i>et al.</i> , 2011	<i>C. unshiu</i>	China	Xi <i>et al.</i> , 2014b
<i>C. microcarpa</i>	Singapore	Cheong <i>et al.</i> , 2012			Sun <i>et al.</i> , 2013
<i>C. mitis</i>	Taiwan	Yu <i>et al.</i> , 2013			Ye <i>et al.</i> , 2011
<i>C. myrtifolia</i>	Italy	Protti <i>et al.</i> , 2015		Croatia	Levaj <i>et al.</i> , 2008
		Barreca <i>et al.</i> , 2011b		Korea	Jung <i>et al.</i> , 2011
		Scordino <i>et al.</i> , 2011		Mauritius	Ramful <i>et al.</i> , 2011
		Barreca <i>et al.</i> , 2010		South Korea	Yoo <i>et al.</i> , 2009
				Spain	Abad <i>et al.</i> , 2014
			Turkey	Kelebek & Selli, 2014	

period (Barreca *et al.*, 2011a; Chen *et al.*, 2011; Yoo *et al.*, 2009). Even though most compounds are found in the peel, as indicated before, studies also have been made to obtain extracts rich in flavonoids from the juice and the seeds. In order to facilitate the extraction of the components, raw material must be ground to a small particle size, improving extract transport from the solid matrix towards the solvent phase.

Raw material can be used either fresh or dry (Ye *et al.*, 2011), the use of fresh raw materials involves the presence of an aqueous phase in the extract, and a further separation, like decantation, must be carried out.

When dry raw material is used, it must be conditioned first, in order to permit cells to stretch back to their original size and shape, allowing the components to

transfer through the cell's structure into solvent bulk. Juices, peels and other tissues can be separated manually (Barreca *et al.*, 2011a) or using commercial extractors.

Preliminary Separation

Organic solvents are often used for the extraction of citrus compounds. There are two main operations to extract the compounds from the citrus matrix. One is simple maceration, with solvents extracting the compounds by diffusion from the citrus matrix (Yoo *et al.*, 2009), where methanol is a frequently used solvent (table 3). The second one is centrifugation of the juices, eliminating aqueous phases (Barreca *et al.*, 2011a).

Table 3. Solvents used for flavonoids extraction in citrus species.

Citrus species	Separation Technique	Solvents	References	Citrus species	Separation Technique	Solvents	References
<i>C. aurantifolia</i>				<i>C. myrtifolia</i>			
Juice	Centrifuged, filtered and evaporated	EASSE	Costa <i>et al.</i> , 2014	Albedo	Centrifuged and filtered	DMF	Barreca <i>et al.</i> , 2011b
	Lyophilized, dissolved in water	Water	Guimaraes <i>et al.</i> , 2010	Flavedo	Centrifuged and filtered	DMF	Barreca <i>et al.</i> , 2011b
Peel	Lyophilized, stirred and filtered	MOH	Guimaraes <i>et al.</i> , 2010	Juice	Centrifuged and filtered	DMF	Barreca <i>et al.</i> , 2010
	Macerated, filtered and evaporated	MWC	Brito <i>et al.</i> , 2014				Barreca <i>et al.</i> , 2011b
	Maceration	MWH	Loizzo <i>et al.</i> , 2013		Stirred, centrifuged and filtered	MFA	Scordino <i>et al.</i> , 2011
Pulp	Macerated, filtered and evaporated	MWC	Brito <i>et al.</i> , 2014	Membrane	Centrifuged and filtered	DMF	Barreca <i>et al.</i> , 2011b
<i>C. aurantium</i>				Pulp	Stirred, centrifuged and filtered	MFA	Scordino <i>et al.</i> , 2011
Juice	Centrifuged and filtered	DMF	Barreca <i>et al.</i> , 2011a	Seeds	centrifuged and filtered	DMF	Barreca <i>et al.</i> , 2011b
Peels	Macerated, centrifuged and filtered	MAW	Lagha & Madani, 2013	Whole	Dried, vortexed, centrifuged and evaporated	MOH	Protti <i>et al.</i> , 2015
Seeds	Ground, macerated, filtered and evaporated	MOH	Moulehi <i>et al.</i> , 2012	<i>C. paradisi</i>			
Whole	Dried, UB30, centrifuged	MDS	Sun <i>et al.</i> , 2013	Juice	Centrifuged and filtered	None	Kelebek, 2010
<i>C. bergamia</i>					Freeze-dried, centrifuged and filtered	MWA	Abad <i>et al.</i> , 2014
Albedo	MWE	Water	DiDonna <i>et al.</i> , 2011		Lyophilized, dissolved in water	Water	Guimaraes <i>et al.</i> , 2010
<i>C. daoianensis</i>					Macerated, dissolved	EAM	Zhang <i>et al.</i> , 2011
Peel & Pulp	Dried, UB30, centrifuged	MOH	Xi <i>et al.</i> , 2014b	Peel	Dried, UB30, centrifuged	MOH	Xi <i>et al.</i> , 2014a
<i>C. erythrosa</i>					Lyophilized, stirred and filtered	MOH	Guimaraes <i>et al.</i> , 2010
Whole	Dried, UB30, centrifuged	MDS	Ye <i>et al.</i> , 2011	Pulp	Dried, UB30, centrifuged	MOH	Xi <i>et al.</i> , 2014a

Citrus species	Separation Technique	Solvents	References	Citrus species	Separation Technique	Solvents	References
<i>C. grandis</i>					Ground, macerated, centrifuged, dissolved	MOH	Zhang <i>et al.</i> , 2011
Epicarp	Dried, UB30, centrifuged	MOH	Li <i>et al.</i> , 2014	Whole	Dried, UB30, centrifuged	MDS	Sun <i>et al.</i> , 2013
Flavedo	UB30, centrifuged, evaporated	MOH	Zhang <i>et al.</i> , 2014b	<i>C. poonensis</i>			
Juice	Macerated, dissolved	EAM	Zhang <i>et al.</i> , 2011	Peel	Dried, UB30, centrifuged	MOH	Xi <i>et al.</i> , 2014b
	UB30, centrifuged, evaporated	MOH	Zhang <i>et al.</i> , 2014b	Pulp	Dried, UB30, centrifuged	MOH	Xi <i>et al.</i> , 2014b
Peel	Dried, UB30, centrifuged	MOH	Xi <i>et al.</i> , 2014a	Whole	Dried, UB30, centrifuged	MDS	Sun <i>et al.</i> , 2013
Pulp	Dried, UB30, centrifuged	MOH	Xi <i>et al.</i> , 2014a				Ye <i>et al.</i> , 2011
	Ground, macerated, centrifuged, dissolved	MOH	Zhang <i>et al.</i> , 2011	<i>C. reticulata</i>			
Whole	Dried, UB30, centrifuged	MDS	Sun <i>et al.</i> , 2013	Juice	Centrifuged and filtered	DMF	Barreca <i>et al.</i> , 2013
		MOH	Duan <i>et al.</i> , 2014		Filtered	None	Kelebek & Selli, 2014
			Li <i>et al.</i> , 2014		Freeze-dried, centrifuged and filtered	MWA	Abad <i>et al.</i> , 2014
<i>C. jambhiri</i>				Peel	Dried, macerated and evaporated	WEA	Makovsek <i>et al.</i> , 2012
Peel	Rectificated	MWPCE	Hamdan <i>et al.</i> , 2011		Dried, UB30, centrifuged	MOH	Xi <i>et al.</i> , 2014b
Seeds	Dried, defatted, rectificated	PMWD	Hamdan <i>et al.</i> , 2011		Dried, ultrasonic bath	Water	Londoño <i>et al.</i> , 2010
<i>C. junos</i>					Lyophilized, macerated, centrifuged	MOH	Zhang <i>et al.</i> , 2014c
	Freeze-dried, UB30, filtered	MDS	Yoo <i>et al.</i> , 2009	Pulp	Dried, UB30, centrifuged	MOH	Xi <i>et al.</i> , 2014b
<i>C. latifolia</i>					Freeze-dried, macerated and centrifuged	MOH	Ramful <i>et al.</i> , 2011
Peel	Dried, ultrasonic bath	Water	Londoño <i>et al.</i> , 2010	Seeds	Ground, macerated, filtered and evaporated	MOH	Moulehi <i>et al.</i> , 2012
<i>C. limetta</i>				<i>C. sinensis</i>			
Juice	Centrifuged and filtered	DMF	Barreca <i>et al.</i> , 2011c	Juice	Centrifuged and filtered	DMF	Barreca <i>et al.</i> , 2014
Peels	Macerated, filtered and evaporated	MOH	Rodriguez <i>et al.</i> , 2014		Filtered and diluted	Water	Andreu <i>et al.</i> , 2010
<i>C. limon</i>					Freeze-dried, centrifuged and filtered	MWA	Abad <i>et al.</i> , 2014
Juice	Freeze-dried, centrifuged and filtered	MWA	Abad <i>et al.</i> , 2014		Lyophilized, dissolved in water	Water	Guimaraes <i>et al.</i> , 2010
	Lyophilized, dissolved in water	Water	Guimaraes <i>et al.</i> , 2010	Pulp	Freeze-dried, macerated and centrifuged	EAA	Pan <i>et al.</i> , 2014
Peel	Lyophilized, stirred and filtered	MOH	Guimaraes <i>et al.</i> , 2010			MOH	Ramful <i>et al.</i> , 2011
	Macerated, filtered and evaporated	MWC	Brito <i>et al.</i> , 2014	Peel	Dried, stirred and filtered	MDS	Chen <i>et al.</i> , 2011
Pulp	Macerated, filtered and evaporated	MWC	Brito <i>et al.</i> , 2014		Dried, ultrasonic bath	Water	Londoño <i>et al.</i> , 2010

Citrus species	Separation Technique	Solvents	References	Citrus species	Separation Technique	Solvents	References
Whole	Dried, UB30, centrifuged	MDS	Sun <i>et al.</i> , 2013		Lyophilized, stirred and filtered	MOH	Guimaraes <i>et al.</i> , 2010
<i>C. maxima</i>				Peels	Macerated, centrifuged and filtered	MAW	Lagha & Madani, 2013
Pulp	Freeze-dried, macerated and centrifuged	MOH	Ramful <i>et al.</i> , 2011	Whole	Dried, UB30, centrifuged	MDS	Sun <i>et al.</i> , 2013
<i>C. medica</i>				<i>C. suaveolens</i>			
Endocarp	Stirred, rotavaporated	EOH	Menichini <i>et al.</i> , 2011b	Whole	Dried, UB30, centrifuged	MDS	Ye <i>et al.</i> , 2011
Mesocarp	Stirred, rotavaporated	EOH	Menichini <i>et al.</i> , 2011b	<i>C. tardiferax</i>			
Peel	Stirred, rotavaporated	EOH	Menichini <i>et al.</i> , 2011a	Whole	Dried, UB30, centrifuged	MDS	Ye <i>et al.</i> , 2011
<i>C. meyeri</i>				<i>C. unshiu</i>			
Pulp	Freeze-dried, macerated and centrifuged	MOH	Ramful <i>et al.</i> , 2011	Juice	Filtered	None	Kelebek & Selli, 2014
<i>C. mitis</i>					Freeze-dried, centrifuged and filtered	MWA	Abad <i>et al.</i> , 2014
Peels	Ground, macerated, filtered and evaporated	EAW	Yu <i>et al.</i> , 2013				

DCF: Diluted, centrifuged and filtered; **DMSO:** Dimethyl sulfoxide; **DMF:** dimethylformamide; **EAA:** Ethanol and ammonium acetate; **EAM:** Ethyl acetate and methanol; **EASSE:** Ethyl acetate, sodium sulfate and ethanol; **EAW:** Ethyl acetate and water; **EOH:** Ethanol; **MAW:** Methanol, acetone and water; **MDS:** Methanol and dimethyl sulfoxide; **MFA:** Methanol and formic acid; **MOH:** Methanol; **MWE:** Microwave-assisted extraction; **MWA:** Methanol, water and acetic acid; **MWC:** Methanol, water and HCl; **MWH:** Methanol, water and n-hexane; **MWPCE:** Methanol, water, light petroleum, chloroform and ethyl acetate; **PMWD:** Light petroleum, methanol, water and dichloromethane; **UB30:** ultrasonic bath; **WEA:** Water, ethanol and acetone.

Purification

The mixtures obtained from extraction are quite complex, showing many species from the different tissues in the fruit. In order to obtain a higher concentration of some compounds, it's necessary to carry out a further purification.

Compound purification has been carried out by column chromatography, allowing high single concentration of compounds (Levaj *et al.*, 2008). Purification through adsorption is versatile, simple and low cost, which makes it attractive for the selective recovery of a variety of phenolics and polyphenols. Adsorption shows other advantages like selectivity, environmental impact and toxicological effects. Studies on the characterization of the detailed interactions between resins and individual plant phenolics are needed for design (Soto *et al.*, 2011).

High speed countercurrent chromatography (HSCC) is also used to extract and purify flavonoids using two-phase solvent systems, flowing simultaneously in opposite directions. In addition, HSCC also realizes multiple forms of the gradient elution process; thus it can be used not only to remove impurities from crude extract of raw materials but also to purify the final product. Moreover, some pure compounds can even be

obtained through one step from crude extract without sample pretreatment (Duo *et al.*, 2011).

Even tough, there is few available data for citrus flavonoids purification processes, i.e. the one used for purifying hesperidin, naringin, and narirutin with a Zorbax C18 column and a mobile phase of citric acid and ammonium acetate in water and methanol 60:40 (Levaj *et al.*, 2008). Also, preparative high performance liquid chromatography (HPLC) using an instrument equipped with a UV-vis detector has not been employed widely in the isolation of flavonoid compounds. Most mobile phases consisted of a linear gradient of acetonitrile in H₂O. Crude juice is diluted with DMF, flavonoids are collected in the HPLC course range time of 5–30 min. The fractions collected are joined, evaporated to dryness in a rotary evaporator and redissolved to regenerate the original concentration of analytes in crude juice (Barreca *et al.*, 2011d).

Analysis methods

Once the extract is obtained, it's important to analyze it, to know if the procedure was correct and the present species were separated as expected.

Qualitative methods

Thin layer chromatography (TLC) continues to be an important method for qualitative investigation of plant compounds because of its inherent advantages— many samples can be analyzed simultaneously and quickly and multiple separation techniques and detection procedures can be applied. TLC is one of the most powerful and general analytical tools used for qualitative purposes, indicating the presence of specific flavonoids in a simpler way than HPLC. It follows from numerous publications that, owing to large polarity differences, it is difficult to find a TLC system which separates similar structure molecules on a single chromatogram.

Most common stationary phase is silica gel, using a mobile phase of mixtures ethyl acetate – methanol – formic acid (Mohammad *et al.*, 2010). Conventional separation on silica gel with moderately polar mobile phases consisting of small amounts of methanol with less polar solvents has been successfully used for the polyphenolic compounds. The retention factor (Rf) values of the different compounds reflects their polarity, given by the number of -OH groups, which displays much more affinity for the stationary phase.

Using the Folin–Ciocalteu reaction, the phenolic compounds form blue complexes with the phosphomolyb-

dic– phosphotungstic reagent at high pH. The analysis is simple, highly reproducible under carefully controlled conditions, and, therefore, widely used. The Folin method represents a classic approach to estimate total phenolic compounds in a variety of matrices. Although the method is nonspecific, it is frequently applied as a measure of total phenolics in biochemical, animal, and clinical trials (Soto *et al.*, 2012). Fluorescence detection of the flavonoids is also used to identify the effective separation of individual flavonoid compounds (Andreu *et al.*, 2010).

Quantitative methods

High performance liquid chromatography (HPLC) is widely used to quantify the amount of flavonoid compounds in the obtained extracts, and there are several methods reported for HPLC sets (table 4). For every method, it must be considered the polarity of the species to be analyzed, so the correct column and mobile phase may be chosen. The hypothesis proposes that the difference in the orientation of the -OH could result in different affinities of the two isomers for the stationary phase and hence their separation. Good characterization of mobile-phase systems can be achieved by determination of relationships between retention and mobile-phase composition.

Table 4. HPLC sets for flavonoids in citrus species.

Citrus species	Column	Mobile phase	Detection	Flavonoids	Authors
<i>C. aurantifolia</i>					
Juice	Ascentis Express C18 50x4.6 mm	(A) H ₂ O / HCOOH (99.9:0.1, v/v), (B) H ₂ O / CH ₃ CN/ 2-propanol/ HCOOH (39.9:20:40:0.1, v/v)	UV-DAD, 190 - 370 nm	Hd	Costa <i>et al.</i> , 2014
Peel	Phenomenex Luna C18, 250x 4.60 mm	(A) 0.1% HCOOH in H ₂ O, (B) MeOH	UV-Vis, 280 nm	Ne, Ni, Ht, Hd, Nb	Loizzo <i>et al.</i> , 2013
	Purospher star-C18 250 x 5 mm	(A) 10% HCOOH in H ₂ O, (B) CH ₃ CN	HPLCMS	Hd, Lu, Ni	Brito <i>et al.</i> , 2014
Pulp	Purospher star-C18 250 x 5 mm	(A) 10% HCOOH in H ₂ O, (B) CH ₃ CN	HPLCMS	Hd, Lu, Ni	Brito <i>et al.</i> , 2014
<i>C. aurantium</i>					
Juice	Discovery C ₁₈ 250x4.6 mm	CH ₃ CN / H ₂ O 0-100%	HPLCMS	Nr, Ni, Nh	Barreca <i>et al.</i> , 2011a
Seeds	Hypersil ODS C18 250x4.6 mm	(A) CH ₃ CN, (B) 0.2% H ₂ SO ₄ in H ₂ O.	UV-Vis, 280 nm	Ni, Hd, Nh	Moulehi <i>et al.</i> , 2012
Whole	Diamonsil C18 250x4.6 mm	(A) MeOH, (B) 4% AcOH (v/v)	UV-DAD, 200 - 400 nm	Nr, Ni, Hd, Nb, Tg	Sun <i>et al.</i> , 2013
<i>C. bergamia</i>					
Albedo	Luna C18 (2) 250 x 4.6 mm	(A) 0.1% HCOOH in H ₂ O, (B) MeOH	UV-Vis, 280 nm	-	DiDonna <i>et al.</i> , 2011
<i>C. daoixianensis</i>					
Pulp	Zorbax SB-C18, 250x4.6 mm	(A) 0.1% HCOOH in H ₂ O, (B) MeOH	UV-DAD, 283 - 367 nm	Nr, Hd, Nb	Xi <i>et al.</i> , 2014b

Citrus species	Column	Mobile phase	Detection	Flavonoids	Authors
<i>C. erythrosa</i>					
Whole	TSK-gel ODS-80TS	H ₃ PO ₄ : MeOH (80:20 – 55:45)%	UV-DAD, 200 – 400 nm	Nr, Hd, Nb, Tg	Ye <i>et al.</i> 2011
<i>C. grandis</i>					
Epicarp	Phenomenex Kinetex 100x2.1 mm	(A) MeOH, (B) 0.1% HCOOH in H ₂ O (v/v)	HPLCMS	Ni, Ne	Li <i>et al.</i> , 2014
Flavedo	Zorbax SB C-18 250 x4 mm	(A) H ₂ O / AcOH (99:1, v/v), (B) CH ₃ CN / AcOH (99:1,v/v).	HPLCMS	Ni, Nh	Zhang <i>et al.</i> , 2011
	Zorbax SB C-18 250 x4 mm	(A) H ₂ O / AcOH (99:1, v/v), (B) CH ₃ CN / AcOH (99:1,v/v).	HPLCMS	Ni	Zhang <i>et al.</i> , 2014b
Juice	Zorbax SB C-18 250 x4 mm	(A) H ₂ O / AcOH (99:1, v/v), (B) CH ₃ CN / AcOH (99:1,v/v).	HPLCMS	Ni	Zhang <i>et al.</i> , 2011
	Zorbax SB C-18 250 x4 mm	(A) H ₂ O / AcOH (99:1, v/v), (B) CH ₃ CN / AcOH (99:1,v/v).	HPLCMS	Ni	Zhang <i>et al.</i> , 2014b
Peels	Acquity UPLC BEH C18 100x2.1 mm	(A) 0.2% AcOH in H ₂ O, (B) MeOH	UPLC-PDA	Nr, Ni, Nh, Ne	Xi <i>et al.</i> , 2014a
Pulp	Acquity UPLC BEH C18 100x2.1 mm	(A) 0.2% AcOH in H ₂ O, (B) MeOH	UPLC-PDA	Nr, Ni, Nh, Ne	Xi <i>et al.</i> , 2014a
Whole	Diamonsil C18 250x4.6 mm	(A) MeOH, (B) 4% AcOH in H ₂ O	UV-DAD, 200 – 400 nm	Nr, Ni, Hd, Nh, Nb, Tg	Sun <i>et al.</i> , 2013
	Agilent Zorbax SB-C18 50x4.6 mm	(A) 0.1% HCOOH in H ₂ O, (B) CH ₃ CN	HPLCMS	Nr, Ni, Ne	Duan <i>et al.</i> , 2014
	Phenomenex Kinetex 100x2.1 mm	(A) MeOH, (B) 0.1% HCOOH in H ₂ O (v/v)	HPLCMS	Ni, Ne	Li <i>et al.</i> , 2014
<i>C. jambhiri</i>					
Peel	LiChro CART 250x 4 mm	(A) H ₂ O – HCOOH (99.5: 0.5, v/v), (B) CH ₃ CN	HPLCMS	Nr, Ni, Hd, Nh	Hamdan <i>et al.</i> , 2011
<i>C. junos</i>					
Juice	Hypersil GOLD C ₁₈	MeOH:9% HAc aqueous, (5:95-40:60)%	UV-Vis, 280 nm	Hd, Ni, Nh, Ne, Lu, Ht	Yoo <i>et al.</i> 2009
<i>C. latifolia</i>					
Peel	Hypersil BDS (C8) 250x 4.6 mm	(A) 0.1% HCOOH in H ₂ O, (B) CH ₃ CN, 75% A and 25% B.	HPLCMS	Hd, Nh	Londoño <i>et al.</i> , 2010
<i>C. limetta</i>					
Juice	Diamonsil C ₁₈	MeOH : CH ₃ CN:PBS (10:40:39, v/v)	UV-Vis, 210 nm	Hd	Barreca <i>et al.</i> , 2011c
Peels	ProntoSIL C18Aq 250x2.00 mm	(A) H ₂ O, (B) CH ₃ CN	HPLCMS	Hd	Rodriguez <i>et al.</i> , 2014
<i>C. limon</i>					
Juice	Phenomenex Luna C18(2) 150x4.6 mm	(A) AcOH – H ₂ O (0.5:99.5, v/v), (B) MeOH	UV-DAD, 280 – 370 nm	Ht, Ne	Abad <i>et al.</i> , 2014
Peel	Purospher star-C18 250 x 5 mm	(A) 10% HCOOH in H ₂ O, (B) CH ₃ CN	HPLCMS	Hd, Lu, Ni	Brito <i>et al.</i> , 2014
Pulp	Purospher star-C18 250 x 5 mm	(A) 10% HCOOH in H ₂ O, (B) CH ₃ CN	HPLCMS	Hd, Lu, Ni	Brito <i>et al.</i> , 2014
Whole	Diamonsil C18 250x4.6 mm	(A) MeOH, (B) 4% AcOH in H ₂ O (v/v)	UV-DAD, 200 – 400 nm	Nr, Hd, Nb	Sun <i>et al.</i> , 2013
<i>C. maxima</i>					
Pulp	Waters Spherisorb ODS-2 150x4.6 mm	(A) H ₂ O – CH ₃ CN (90:10, v/v), (B) CH ₃ CN	UV-DAD, 280-330 nm	Ni, Nh, Nr	Ramful <i>et al.</i> , 2011

Citrus species	Column	Mobile phase	Detection	Flavonoids	Authors
<i>C. medica</i>					
Endocarp	Phenomenex Luna C18, 250x 4.60 mm	(A) 0.1% HCOOH in H ₂ O, (B) MeOH	UV-Vis, 280 nm	Hd,	Menichini <i>et al.</i> , 2011b
Mesocarp	Phenomenex Luna C18, 250x 4.60 mm	(A) 0.1% HCOOH in H ₂ O, (B) MeOH	UV-Vis, 280 nm	Ni, Hd	Menichini <i>et al.</i> , 2011b
Peel	Phenomenex Luna C18, 250x 4.60 mm	(A) 0.1% HCOOH in H ₂ O, (B) MeOH	UV-Vis, 280 nm	Ni, Ht, Nb	Menichini <i>et al.</i> , 2011a
<i>C. mitis</i>					
Peel	Merck RP-18 250x4.6 mm	(A) 2% AcOH in H ₂ O (v/v), (B) 0.5% AcOH in H ₂ O / CH ₃ CN (1:1, v/v)	UV-DAD, 220 - 350 nm	Ni, Hd, Nb, Tg	Yu <i>et al.</i> , 2013
<i>C. myrtifolia</i>					
Albedo	Discovery C ₁₈ 250x4.6 mm	CH ₃ CN / H ₂ O 0-100%	HPLCMS	Nr, Ni, Nh, Nb, Tg	Barreca <i>et al.</i> , 2011b
Flavedo	Discovery C ₁₈ 250x4.6 mm	CH ₃ CN / H ₂ O 0-100%	HPLCMS	Nr, Ni, Nh, Nb, Tg	Barreca <i>et al.</i> , 2011b
Juice	Discovery C ₁₈ 250x4.6 mm	CH ₃ CN / H ₂ O 0-100%	HPLCMS	Nr, Nh, Ni	Barreca <i>et al.</i> , 2010 Barreca <i>et al.</i> , 2011b
	Phenomenex Luna C18, 250x 4.60 mm	(A) 0.3% HCOOH in H ₂ O, (B) 0.3% formic acid in CH ₃ CN	HPLCMS	Ni, Nh, Nb, Tg	Scordino <i>et al.</i> , 2011
Membrane	Discovery C ₁₈ 250x4.6 mm	CH ₃ CN / H ₂ O 0-100%	HPLCMS	Nr, Ni, Nh	Barreca <i>et al.</i> , 2011b
Pulp	Phenomenex Luna C18, 250x 4.60 mm	(A) 0.3% HCOOH in H ₂ O, (B) 0.3% formic acid in CH ₃ CN	HPLCMS	Ni, Nh, Nb, Tg	Scordino <i>et al.</i> , 2011
<i>C. paradisi</i>					
Flavedo	Zorbax SB C-18 250 x4 mm	(A) H ₂ O / AcOH (99:1, v/v), (B) CH ₃ CN / AcOH (99:1,v/v).	HPLCMS	Ni, Hd, Nh	Zhang <i>et al.</i> , 2011
Juice	Beckman Ultrasphere ODS 205x4.6mm	(A) H ₂ O / HCOOH (95:5; v/v), (B) CH ₃ CN / (A) (60:40; v/v)	UV-DAD, 200 - 600 nm	Nr, Ni, Hd, Nh	Kelebek, 2010
	Zorbax SB C-18 250 x4 mm	(A) H ₂ O / AcOH (99:1, v/v), (B) CH ₃ CN/ AcOH (99:1,v/v).	HPLCMS	Ni, Hd, Nh	Zhang <i>et al.</i> , 2011
	Phenomenex Luna C18(2) 150x4.6 mm	(A) AcOH - H ₂ O (0.5:99.5, v/v), (B) MeOH	UV-DAD, 280 - 370 nm	Ht, Ne	Abad <i>et al.</i> , 2014
Peel	Acquity UPLC BEH C18 100x2.1 mm	(A) 0.2% AcOH in H ₂ O, (B) MeOH	UPLC-PDA	Nr, Ni, Hd, Nh, Ne, Ht	Xi <i>et al.</i> , 2014a
Pulp	Acquity UPLC BEH C18 100x2.1 mm	(A) 0.2% AcOH in H ₂ O, (B) MeOH	UPLC-PDA	Nr, Ni, Hd, Nh, Ne, Ht	Xi <i>et al.</i> , 2014a
Whole	Diamonsil C18 250x4.6 mm	(A) MeOH, (B) 4% AcOH in H ₂ O (v/v)	UV-DAD, 200 - 400 nm	Nr, Ni, Hd, Nh, Nb, Tg	Sun <i>et al.</i> , 2013
<i>C. poonensis</i>					
Pulp	Zorbax SB-C18, 250x4.6 mm	(A) 0.1% HCOOH in H ₂ O, (B) MeOH	UV-DAD, 283 - 367 nm	Nr, Hd, Nb	Xi <i>et al.</i> , 2014b
Whole	TSK-gel ODS-80TS	H ₃ PO ₄ : MeOH (80:20 - 55:45)%	UV-DAD, 200 - 400 nm	Nr, Hd, Nb, Tg	Ye <i>et al.</i> 2011
	Diamonsil C18 250x4.6 mm	(A) MeOH , (B) 4% AcOH in H ₂ O (v/v)	UV-DAD, 200 - 400 nm	Nr, Hd, Nb, Tg	Sun <i>et al.</i> , 2013
<i>C. reticulata</i>					
Juice	Discovery C ₁₈ 250x4.6 mm	CH ₃ CN / H ₂ O 0-100%	HPLCMS	Nr, Hd, Nb, Tg	Barreca <i>et al.</i> , 2010 Barreca <i>et al.</i> , 2011b

Citrus species	Column	Mobile phase	Detection	Flavonoids	Authors
	Phenomenex Luna C18(2) 150x4.6 mm	(A) AcOH / H ₂ O (0.5:99.5, v/v), (B) MeOH	UV-DAD, 280 – 370 nm	Ht, Ne	Abad <i>et al.</i> , 2014
	Beckman Ultrasphere ODS 250x4.6 mm	(A) H ₂ O / HCOOH (95:5; v/v), (B) CH ₃ CN / (A) (60:40; v/v)	UV-DAD, 200-600 nm	Nr, Hd	Kelebek & Selli, 2014
Peel	Hypersil BDS (C8) 250x 4.6 mm	(A) 0.1% HCOOH in H ₂ O, (B) CH ₃ CN, 75% A and 25% B.	HPLCMS	Hd, Nh	Londoño <i>et al.</i> , 2010
	Chromsep SS C-18 250x4.6 mm	(A) MeOH, (B) 2% AcOH in H ₂ O (v/v)	UV-DAD, 282-330 nm	Hd, Nb, Tg	Makovsek <i>et al.</i> , 2012
	Zorbax SB-C18, 250x4.6 mm	(A) 0.1% HCOOH in H ₂ O, (B) MeOH	UV-DAD, 283 – 367 nm	Nr, Ni, Hd, Nh, Ne, Lu, Nb, Tg	Zhang <i>et al.</i> , 2014c
Pulp	Waters Spherisorb ODS-2 150x4.6 mm	(A) H ₂ O – CH ₃ CN (90:10, v/v), (B) CH ₃ CN	UV-DAD, 280-330 nm	Hd, Nr	Ramful <i>et al.</i> , 2011
	Zorbax SB-C18, 250x4.6 mm	(A) 0.1% HCOOH in H ₂ O, (B) MeOH	UV-DAD, 283 – 367 nm	Nr, Ni, Hd, Nh, Nb	Xi <i>et al.</i> , 2014b
Seeds	Hypersil ODS C18 250x4.6 mm	(A) CH ₃ CN, (B) 0.2% H ₂ SO ₄ in H ₂ O	UV-Vis, 280 nm	Ni, Hd	Moulehi <i>et al.</i> , 2012
<i>C. sinensis</i>					
Juice	Onyx monolithic C ₁₈ , 100x4.6 mm	Ternary mixture of 0.15 mol L ⁻¹ acetic buffer, pH 4.0, CH ₃ CN and MeOH.	SLM Aminco AB2 luminescence spectrometer, 585-625 nm	Ni, Hd, Ne	Andreu <i>et al.</i> , 2010
	Phenomenex Luna C18(2) 150x4.6 mm	(A) AcOH – H ₂ O (0.5:99.5, v/v), (B) MeOH	UV-DAD, 280 – 370 nm	Ht, Ne	Abad <i>et al.</i> , 2014
	Discovery C ₁₈ 250x4.6 mm	CH ₃ CN / H ₂ O 0-100%	HPLCMS	Nr, Hd	Barreca <i>et al.</i> , 2013
Peel	Hypersil BDS (C8) 250x 4.6 mm	(A) 0.1% HCOOH in H ₂ O, (B) CH ₃ CN, 75% A and 25% B.	HPLCMS	Hd, Nh, Nb, Tg	Londoño <i>et al.</i> , 2010
	Hypersil GOLD C ₁₈ 250x 4.6 mm	(A) MeOH, (B) 9% AcOH in H ₂ O	UV-Vis, 280 nm	Ni, Nh	Chen <i>et al.</i> , 2011
Pulp	Waters Spherisorb ODS-2 150x4.6 mm	(A) H ₂ O – CH ₃ CN (90:10, v/v), (B) CH ₃ CN	UV-DAD, 280-330 nm	Hd, Nr	Ramful <i>et al.</i> , 2011
	Agilent Eclipse XDB-C ₁₈ 150x2.1 mm	(A) 1 mM NH ₄ F in H ₂ O, (B) MeOH	HPLCMS	Hd, Nh, Ni, Nb	Pan <i>et al.</i> , 2014
Whole	Diamonsil C18 250x4.6 mm	(A) MeOH, (B) 4% AcOH in H ₂ O (v/v)	UV-DAD, 200 – 400 nm	Nr, Hd, Nb, Tg	Sun <i>et al.</i> , 2013
<i>C. suavisissima</i>					
Whole	TSK-gel ODS-80TS	H ₃ PO ₄ : MeOH (80:20 – 55:45)%	UV-DAD, 200 – 400 nm	Ni, Nr, Hd, Nb, Tg	Ye <i>et al.</i> 2011
<i>C. succosa</i>					
Whole	TSK-gel ODS-80TS	H ₃ PO ₄ : MeOH (80:20 – 55:45)%	UV-DAD, 200 – 400 nm	Nr, Hd, Nb, Tg	Ye <i>et al.</i> 2011
<i>C. tardiferax</i>					
Whole	TSK-gel ODS-80TS	H ₃ PO ₄ : MeOH (80:20 – 55:45)%	UV-DAD, 200 – 400 nm	Nr, Hd, Nb, Tg	Ye <i>et al.</i> 2011
<i>C. unshiu</i>					
Juice	Phenomenex Luna C18(2) 150x4.6 mm	(A) AcOH – H ₂ O (0.5:99.5, v/v), (B) MeOH	UV-DAD, 280 – 370 nm	Ht, Ne	Abad <i>et al.</i> , 2014
	Beckman Ultrasphere ODS 250x4.6 mm	(A) H ₂ O / HCOOH (95:5; v/v), (B) CH ₃ CN / (A) (60:40; v/v)	UV-DAD, 200-600 nm	Nr, Hd	Kelebek & Selli, 2014

Citrus species	Column	Mobile phase	Detection	Flavonoids	Authors
Peel	SunFire C18 column 250x4.6 mm	(A) MeOH, (B) 0.5% AcOH in H ₂ O	UV-DAD, 280 nm	Nr, Hd, Ni, Ne, Ht	Jung <i>et al.</i> , 2011
Pulp	Zorbax SB-C18, 250x4.6 mm	(A) 0.1% HCOOH in H ₂ O, (B) MeOH	UV-DAD, 283 - 367 nm	Nr, Hd, Nb	Xi <i>et al.</i> , 2014b
Whole	TSK-gel ODS-80TS	H ₃ PO ₄ : MeOH (80:20 - 55:45)%	UV-DAD, 200 - 400 nm	Nr, Hd, Nb, Tg	Ye <i>et al.</i> 2011
	Diamonsil C18 250x4.6 mm	(A) MeOH, (B) 4% AcOH in H ₂ O (v/v)	UV-DAD, 200 - 400 nm	Nr, Hd, Nb, Tg	Sun <i>et al.</i> , 2013

AcOH: acetic acid, **Hd:** Hesperidin, **HPLCMS:** High performance liquid chromatography coupled with ESI-MS/MS detection, **Ht:** Hesperetin, **MeOH:** Methanol, **Ni:** Naringin, **Nh:** Neohesperidin, **Ne:** Naringenin, **Nr:** Narirutin, **Nb:** Nobiletin, **Lu:** Luteolin, **Tg:** Tangeretin, **UPLC-PDA:** Ultra performance liquid chromatography with photodiode array detector, **UV-DAD:** Ultraviolet diode array detector, **UV-Vis:** Ultraviolet and visible detector.

Gas chromatography is also used, but due to its characteristics, volatile samples are required (Cheong *et al.*, 2012). In addition, water samples are not allowed, only the species that are soluble in volatile solvent should be measured.

Liquid chromatography has been the most used technique to analyze the obtained extracts from citrus fruits (Jiang *et al.*, 2011), performing tests at different pH levels and using a huge variety of detection methods. High performance liquid chromatography (HPLC) combined with ultraviolet (UV) detection and mass spectrometric (MS), electrospray ionization (ESI), and/or two mass spectrometer tandem (MS/MS) measurement provides the most useful techniques currently available to identify specific classes and structures of food phenolics (Barreca *et al.*, 2013; He *et al.*, 2011). The differences in ultraviolet spectra are an important tool in determining which wavelengths to monitor for detection and quantification by HPLC (Soto *et al.*, 2012; González *et al.*, 2010).

Conclusions

Since citrus fruits are original from Asia, most of the varieties on the current literature were found and studied in Far East countries. It doesn't mean that others countries are not interested in studying citrus flavonoids, only that they don't have so much of wild or endemic citrus species. Most of the studies used grounded dry raw material for extraction, from peels and whole fruit. Methanol mixtures are the main solvent used in the extraction of citrus flavonoids.

There's few literature found about purification of single flavonoids, since few details of purification behavior of single flavonoid compounds have been provided in most of the publications dealing with their isolation and structural elucidation, and, in some cases, inadequate information is supplied, there is an entire opportunity field for new research in purification techniques, and their efficiencies in flavonoids isolation.

High performance liquid chromatography has been used as the best analysis technique to quantify and

identify structures of the obtained flavonoids and thin layer chromatography provides a quick method for qualitative identification of the compounds along the experimental process.

Acknowledgements

Authors are grateful to Postgraduate Department of Chemical Engineering at Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo for providing access to databases. The work was supported by the CONACYT, México, scholarship number 220045/206495.

References

- Abad-García, B., Garmón-Lobato, S., Sánchez-Ilárduya, M.B., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F., & Alonso-Salces, R.M. (2014). Polyphenolic contents in citrus fruit juices: authenticity assessment. *European Food Research and Technology*, 238, 803-818.
- Andreu-Navarro, A., Fernandez-Romero, J.M., & Gómez-Hens, A. (2010). Long-Wavelength Fluorescence Detection of flavonoids in orange juices by LC. *Chromatographia*, 72, 1115-1120.
- Alvarez, R., Carvalho, C.P., Sierra, J., Lara, O., Cardona, D., Londoño, J. (2012). Citrus juice extraction systems: Effect on chemical composition and antioxidant a Activity of clementine juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 774-781.
- Arab, L. & Liebeskind, D. (2010). Tea, flavonoids and stroke in man and mouse. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501, 31-36.
- Asikin, Y., Maeda, G., Tamaki, H., Mizu, M., Oku, H., & Wada, K. (2015). Cultivation line and fruit ripening discriminations of Shiiikuwasha (*Citrus depressa* Hayata) peel oils using aroma compositional, electronic nose, and antioxidant analyses. *Food Research International*, 67, 102-110.
- Barreca, D., Bellocco E., Caristi C., Leuzzi U., & Gattuso G. (2010). Flavonoid composition and antioxidant activity of juices from chinotto (*Citrus x myrtifolia* Raf.) fruits at different ripening stages. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 58, 3031-3036.
- Barreca D., Bellocco E., Caristi C., Leuzzi U., & Gattuso G. (2011a). Distribution of C- and O-glycosyl flavonoids, (3-hydroxy-3-methylglutaryl) glycosyl flavanones and furocoumarins in *Citrus aurantium* L. juice. *Food Chemistry*, 124, 576-582.
- Barreca D., Bellocco E., Caristi C., Leuzzi U., & Gattuso G. (2011b). Elucidation of the flavonoid and furocoumarin composition and radical-scavenging activity of green and ripe chinotto (*Citrus myrtifolia* Raf.) fruit tissues, leaves and seeds. *Food Chemistry*, 129, 1504-1512.
- Barreca D., Bellocco, E., Caristi, C., Leuzzi, U., & Gattuso, G. (2011c). Flavonoid profile and radical-scavenging activity of Mediterra-

- nean sweet lemon (*Citrus limetta* Risso) juice. *Food Chemistry*, 44, 2190-2197.
- Barreca, D., Bellocco, E., Caristi, C., Leuzzi, U., & Gattuso, G. (2011d). Kumquat (*Fortunella japonica* Swingle) juice: Flavonoid distribution and antioxidant properties. *Food Chemistry*, 129, 417-422.
- Barreca, D., Bellocco, E., Leuzzi, U., & Gattuso, G. (2014). First evidence of C- and O-glycosyl flavone in blood orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice and their influence on antioxidant properties. *Food Chemistry*, 149, 244-252.
- Barreca, D., Bisignano, C., Ginestra, G., Bisignano, G., Bellocco, E., Leuzzi, U., & Gattuso, G. (2013). Polymethoxylated, C- and O-glycosyl flavonoids in tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) juice and their influence on antioxidant properties. *Food Chemistry*, 141, 1481-1488.
- Brito, A., Ramirez, J.E., Areche, C., Sepúlveda, B., & Simirgiotis, M.J. (2014). HPLC-UV-MS Profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile. *Molecules*, 19, 17400-17421.
- Buer, C.S., Imin, N., Djordjevic, M.A. (2010). Flavonoids: New roles for old molecules. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 98-111.
- Celiz, G., Daz, M. & Audisio, M.C. (2011). Antibacterial activity of naringin derivatives against pathogenic strains. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 731-738.
- Chen, M.L., Yang, D.J., & Liu, S.C. (2011). Effects of drying temperature on the flavonoid, phenolic acid and antioxidative capacities of the methanol extract of citrus fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) peels. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1179-1185.
- Cheong, M.W., Zhu, D., Sng, J., Liu, S.Q., Zhou, W., Curran, P., Yu, B. (2012). Characterization of calamansi (*Citrus microcarpa*). Part II: Volatiles, physicochemical properties and non-volatiles in the juice. *Food chemistry*, 134, 696-703.
- Codoñer-Franch, P. & Valls-Bellés, V. (2010). Citrus as functional foods. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 8(4), 173-184.
- Costa, R., Russo, M., DeGrazia, S., Grasso, E., Dugo, P., & Mondello, L. (2014). Thorough investigation of the oxygen heterocyclic fraction of lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) juice. *Journal of Separation Science*, 37, 792-797.
- Cushnie, T.P.T. & Lamb, A.J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38, 99-107.
- DiDonna, L., Galluci, G., Malaj, N., Romano, E., Tagarelli, A., Sindona, G. (2011). Recycling of industrial essential oil waste: *Bruti-ridin* and *Melitidin*, two anticholesterolaemic active principles from bergamot albedo. *Food chemistry*, 125, 438-441.
- DiDonna, L., Taverna, D., Mazzoti, F., Benabdelkamel, H., Attya M., & Sindona G. (2013). Comprehensive assay of flavanones in citrus juices and beverages by UHPLC-ESI-MS/MS and derivatization chemistry. *Food chemistry*, 141, 2328-2333.
- Duan, L., Guo, L., Dou, L.L., Yu, K.Y., Liu, E.H., & Li, P. (2014). Comparison of chemical profiling and antioxidant activities of fruits, leaves, branches, and flowers of *Citrus grandis* 'Tomentosa'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 11122-11129.
- Duo-Long, D. Yuan-Yuan, Z., Xiao-Fen, C., Xin-Yi, H, & Shi-Lan, F. (2011). Advances in application of high-speed countercurrent chromatography in separation and purification of flavonoids. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 39(2), 269-275.
- González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D.A., & García-Viguera, C. (2010). Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 327-345.
- Guimaraes, R., Barros, L., Barreira, J.C.M., Sousa, M.J., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. (2010). Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 99-106.
- Hamdan, D., El-Readi, M.Z., Tahrani, A., Herrmann, F., Kaufmann, D., Farrag, N., El-Shazly, A., Wink, M. (2010). Chemical composition and biological activity of *Citrus jambhiri* Lush. *Industrial Crops and Products*, 32, 269-274.
- He, D., Shan, Y., Wu, Y., Liu, G., Chen, B., Yao, S. (2011). Simultaneous determination of flavanones, hydroxycinnamic acids and alkaloids in citrus fruits by HPLC-DAD-ESI/MS. *Food Chemistry*, 127, 880-885.
- Jiang, M.H., Yang, L., Zhu, L., Piao, J.H. & Jiang, J.G. (2011). Comparative GC/MS analysis of essential Oils extracted by 3 methods from the bud of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. *Journal of Food Science*, 76(9), 1219-1225.
- Jung, H.K., Jeong, Y.S., Park, C.D., Park, C.H., Hong, J.H. (2011). Inhibitory effect of citrus peel extract on lipid accumulation of 3T3-L1 adipocytes. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54(2), 169-176.
- Kelebek, H. (2010). Sugars, organic acids, phenolic compositions and antioxidant activity of Grapefruit (*Citrus paradisi*) cultivars grown in Turkey. *Industrial Crops and Products*, 32, 269-274.
- Kelebek, H & Selli, S. (2014). Identification of phenolic compositions and the antioxidant capacity of mandarin juices and wines. *Journal of Food Science and Technology*, 51(6), 1094-1101.
- Lagha-Benamrouche, S., & Madani, K. (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria:Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*, 50, 723-730.
- Lampila, P., van Lieshout, M., Gremmen, B., & Lähteenmäki, L. (2009). Consumer attitudes towards enhanced flavonoid content in fruit. *Food Research International*, 42, 122-129.
- Ledesma-Escobar, C.A., & Luque de Castro, M.D. (2014). Towards a comprehensive exploitation of citrus. *Trends in Food Science and Technology*, 39, 63-75.
- Levaj, B., Dragovic-Uzelac, V., Bursac-Kovacevic, D., & Krasnici, N. (2008). Determination of flavonoids in pulp and peel of mandarin fruits. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 74, 3, 221-225.
- Li, P.L., Liu, M.H., Hu, J.H., Su, W.W. (2014). Systematic chemical profiling of *Citrus grandis* 'Tomentosa' by ultra-fast liquid chromatography/diode-array detector/quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 90, 167-179.
- Loizzo, M.R., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., DeLuca, D., Colica, C., Minichini, F. (2013). Evaluation of Citrus aurantifolia peel and leaves extracts for their chemical composition, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2960-2967.
- Londoño-Londoño, J., Rodrigues de Lima, V., Lara, O., Gil, A., Crecsynsky Pasa, T.B., Arango, G.J., Ramirez Pineda, J.R. (2010). Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chemistry*, 119, 81-87.
- Lorente, J., Vegara, S., Martí, N., Ibarz, A., Coll, L., Hernández, J., Valero, M., & Saura, D. (2014). Chemical guide parameters for Spanish lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.) juices. *Food Chemistry*, 162, 186-191.
- Makovsek, K., Knez, Z., & Skerget, M. (2012). Influence of process parameters on the extraction of flavanones from mandarin peel. *Acta Chim Slovenia*, 59, 879-887.
- Menichini, F., Tundis, R., Loizzo, M.R., Bonesi, M., Liu, B., Jones, P., Persaud, S.J., Mastellone, V., Lombardi, P., Houghton, P.J., Avallone, Menichini, F. (2011a). *C. medica* cv Diamante peel chemical composition and influence on glucose homeostasis and metabolic parameters. *Food Chemistry*, 124, 1083-1089.
- Menichini, F., Loizzo, M.R., Bonesi, M., Conforti, F., DeLuca, D., Statti, G.A., Cindio, B., Menichini, F., Tundis, R. (2011b). Phytochemical profile, antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic potential of hydroalcoholic extracts from *Citrus medica* L. cv Diamante flowers, leaves and fruits at two maturity stages. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1549-1555.
- Mohammad, A., Bhawani, S.A., & Sharma, S. (2010). Analysis of herbal products by thin-layer chromatography: A Review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1, (2), 1-51.

- Montes-Belmont, R. (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología*, 29, 73-82.
- Moulehi, I., Bourgou, S., Ourghemmi, I., & Tounsi, M.S. (2012). Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. *Industrial Crops and Products*, 39, 74-80.
- Natarajan, N., Thamaraiselvan, R., Lingaiah, H., Srinivasan, P., Periyasamy, B.M. (2011). Effect of flavonone hesperidin on the apoptosis of human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Bio-medicine & Preventive Nutrition*, 1, 207-215.
- Neves, A.L., Chinali Komesu, M. & Sala Di Matteo, M.A. (2010). Effects of Green Tea Use on Wound Healing. *International Journal of Morphology*. *Morphol.*, 25(3):905-910.
- Özçelik, B., Kartal, M., & Orhan, I. (2011). Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology*, 49(4), 396-402.
- Pan, Z., Li, Y., Deng, X., & Xiao, S. (2014). Non-targeted metabolomic analysis of orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) wild type and bud mutant fruits by direct analysis in real-time and HPLC-electrospray mass spectrometry. *Metabolomics*, 10, 508-523.
- Pekal, A., Drozd, P., & Biesaga, M. (2011). Evaluation of the antioxidant properties of fruit and flavoured black teas. *European Journal of Nutrition*, 50, 681-688.
- Procházková, D., Boušová, I. & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82, 513-523.
- Ramful, D., Tarnus, E., Aruoma, O.I., Bourdon, E., & Baborun, T. (2011). Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps. *Food Research International*, 44, 2088-2099.
- Rodríguez-Rivera, M.P., Lugo-Cervantes, E., Winterhalter, P., & Jerz, G. (2014). Metabolite profiling of polyphenols in peels of *Citrus limetta* Risso by combination of preparative high-speed counter-current chromatography and LC-ESI-MS/MS. *Food Chemistry*, 158, 139-152.
- Rousos, P.A. (2011). Phytochemicals and antioxidant capacity of orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Salustiana) juice produced under organic and integrated farming system in. *Scientia Horticulturae*, 129, 235-258.
- Sandoval-Montemayor, N.E., García, A., Elizondo-Treviño, E., Garza-González, E., Alvarez, L., Camacho-Corona, M.R. (2012). Chemical composition of hexane extract of *Citrus aurantifolia* and Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of some of its constituents. *Molecules*, 17, 11173-11184.
- Sanfélix-Gimeno, G., Peiró, S., Libro, J., Ausejo-Segura, M., Suárez-Alemán, C., Molina-López, T., Celaya, M.C., Castaño-Riera, E. (2010). Population analysis by area of health of changes in consumption, price and expenditure of cardiovascular drugs in eight autonomous communities, Spain, *Revista Española Salud Pública*, 84, 4, 389-407.
- Scordino, M., Sabatino, L., Belligno, A., & Gagliano, G. (2011). Flavonoids and furocoumarins distribution of unripe chinotto (*Citrus x myrtifolia Rafinesque*) fruit: beverage processing homogenate and juice characterization. *European Food Research and technology*, 233, 759-767.
- Soto, M.L., Moure, A., Domínguez, H., & Parajó, J.C. (2011). Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review. *Journal of Food Engineering*, 105, 1-27.
- Soto-Vaca, A., Gutierrez, A., Losso, J.N., Xu, Z., & Finley, J.W. (2012). Evolution of Phenolic Compounds from Color and Flavor Problems to Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 6658-6677.
- Sun, Y., Qiao, L., Shen, Y., Jiang, P., Chen, J., & Ye, X. (2013). Phytochemical profile and antioxidant activity of physiological drop of citrus fruits. *Journal of Food Science*, 78(1), C37-C42.
- Tham, W.W. & Liew, K.C. (2014). Influence of different extraction temperatures and methanol solvent percentages on the total phenols and total flavonoids from the heartwood and bark of *Acacia auriculiformis*. *European Journal of Wood and Wood Products*, 72, 67-72.
- Vikram, A., Jayaprakasha, G.K., Jesudhasan, P.R., Pillai, S.D. & Patil, B.S. (2010). Suppression of bacterial cell-cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 515-527.
- Wang, S., Chen, P., Jiang, W., Wu, L., Chen, L., Fan, X., Wang, Y. & Cheng, Y. (2014). Identification of the effective constituents for anti-inflammatory activity of Ju-Zhi-Jiang-Tang, an ancient traditional Chinese medicine formula. *Journal of Chromatography A*, 1348, 105-124.
- Xi, W., Fang, B., Zhao, Q., Jiao, B., & Zhou, Z. (2014a). Flavonoid composition and antioxidant activities of Chinese local pummelo (*Citrus grandis* Osbeck.) varieties. *Food Chemistry*, 161, 230-238.
- Xi, W., Zhang, Y., Sun, Y., Shen, Y., & Zhou, Z. (2014b). Phenolic composition of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco.) pulps and their antioxidant properties. *Industrial Crops and Products*, 52, 466-474.
- Ye, X.Q., Chen, J.C., Liu, D.H., Jiang, P., Shi, J., Xue, S., Wu, D., Xu, J.G., & Kakuda, Y. (2011). Identification of bioactive composition and antioxidant activity in young mandarin fruits. *Food Chemistry*, 124, 1561-1566.
- Yoo, K., Hwang, I.K., Park, J.H., & Moon, B. (2009). Comparative flavonoids contents of selected herbs and associations of their radical scavenging activity with antiproliferative actions in V79-4 Cells. *Journal of Food Science*, 74, 6, C462-468.
- Yu, E.A., Kim, G.P., Jeong, S.W., Park, S., Lee, S.J., Kim, J.H., Lee, W.S., Bark, K.M., Jin, J.S., & Shin, S.C. (2014). Flavonoid profile and biological activity of Korean citrus varieties (II): Pyunkyul (*Citrus tangerina* Hort. ex Tanaka) and overall contribution of its flavonoids to antioxidant effect. *Journal of Functional Foods*, 6, 637-642.
- Yu, M.W., Lou, S.N., Chiu, E.M., & Ho, C.T. (2013). Antioxidant activity and effective compounds of immature calamondin peel. *Food Chemistry*, 136, 1130-1135.
- Zang, L., Shimada, Y., Kawajiri, J., Tanaka, T., & Nishimura, N. (2014). Effects of Yuzu (*Citrus junos* Siebold ex Tanaka) peel on the diet-induced obesity in a zebrafish model. *Journal of Functional Food*, 10, 499-510.
- Zhang, M., Duan, C., Zang, Y., Huang, Z., & Liu, G. (2011). The flavonoid composition of flavedo and juice from the pummelo cultivar (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) and the grapefruit cultivar (*Citrus paradisi*) from China. *Food Chemistry*, 129, 1530-1536.
- Zhang, M., Jiang, S., Qian, D., Shang, E.X., & Duan, J.A. (2014a). Determination of metabolism of neohesperidin by human intestinal bacteria by UPLC-Q-TOF/MS. *Chromatographia*, 77, 439-445.
- Zhang, M., Nan, H., Wang, Y., Jiang, X., & Li, Z. (2014b). Comparison of Flavonoid compounds in the flavedo and juice of two pummelo cultivars (*Citrus grandis* L. Osbeck) from different cultivation regions in China. *Molecules*, 19, 17314-17328.
- Zhang, Y., Sun, Y., Xi, W., Shen, Y., Qiao, L., Zhong, L., Ye, X., & Zhou, Z. (2014c). Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits. *Food Chemistry*, 145, 674-680.

Revisión del agave y el mezcal

Review of agave and mezcal

*Elia Pérez Hernández**, *Ma. del Carmen Chávez Parga**, *Juan Carlos González Hernández***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.49552

Resumen

En el presente trabajo, se efectuó una compilación de investigaciones realizadas sobre las diferentes etapas del proceso productivo del mezcal a partir de agave en algunas regiones productoras de México; con el propósito de explicar las problemáticas que enfrenta la cadena productiva agave-mezcal y las estrategias científicas que se han desarrollado para solucionarlas. Con ello se pretende lograr su resistencia y persistencia productiva en el mercado, elaborando un producto que cumpla con las características químicas establecidas por las normas oficiales mexicanas de producción y certificación de calidad, además de ofrecer posibles medidas de control en los procesos para estandarizar el producto y finalmente lograr etapas más eficientes en el proceso de producción.

Palabras clave: mezcal, agave, levadura, fermentación.

Abstract

In this paper, a compilation of investigations of the different stages in the production process of mezcal from agave in some producers regions of Mexico is carried out; to explain some of the problems faced by the productive chain agave-mezcal and scientific strategies that are being developed in the country to solve them. This is intended to achieve its resistance and productive persistence in the market, producing a product that meets the chemical characteristics established by the Mexican official standards of production and quality certification, in addition to establishing more measures of control processes to standardize the product and finally to achieve more efficient steps in the production process.

Key words: mezcal, agave, yeast, fermentation.

Recibido: octubre 16 de 2015

Aprobado: mayo 18 de 2016

Introducción

El mezcal es una bebida alcohólica, tradicional de México, la cual es obtenida por procesos artesanales en su mayoría, así como también por procesos tecnificados, que incluyen las siguientes etapas de producción: la selección y corte de la materia prima, la cocción del agave, la molienda del mosto, la fermentación del jugo fructosado, la destilación, la rectificación y la maduración del destilado. Eventos durante cualquiera de estas etapas tienen el potencial de afectar la calidad sensorial y química del producto final, así como sus rendimientos. Estas características son factores clave para una buena aceptación por el consumidor

en función de las características organolépticas que percibe, como el sabor, el aroma y el cuerpo. Como se hará mención en las siguientes secciones, existen numerosas investigaciones basadas en el estudio y caracterización de las etapas de producción de bebidas alcohólicas destiladas como el bacanora, mezcal, sotol y tequila, que van desde la cocción adecuada de la materia prima, para hidrolizar los fructanos y liberar los azúcares fermentables, así como la identificación de compuestos químicos producidos durante la cocción. En el caso de la fermentación es de vital importancia la identificación de la cepa de levadura empleada y de otros microorganismos presentes, para identificar

* División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Avenida Francisco J. Mújica S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 58030, Morelia, Michoacán, México, email: ely_ph@hotmail.com; carmen_pchavez@yahoo.com

** Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Ing. Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia, Av. Tecnológico # 1500, Colonia Lomas de Santiaguillo, C. P. 58120, Morelia, Michoacán, México. email: jcgh1974@yahoo.com.

la dinámica poblacional en los mostos propios de un proceso artesanal, además de la identificación de los factores que afectan el proceso como el contenido de azúcares, pH, sales minerales y temperatura. En el caso de la destilación del mosto fermentado, los compuestos volátiles son comúnmente asociados con las propiedades sensoriales, aromáticas y al sabor de la bebida, su contenido y concentración en los destilados depende en gran medida de los microorganismos contenidos naturalmente o adicionadas en la fermentación, produciendo un número elevado de distintos compuestos, que en algunos casos pueden ser tóxicos para el organismo, motivo por el cual se debe cumplir con las especificaciones que establece la norma reguladora para poder producir y comercializar la bebida alcohólica destilada.

Producción de mezcal en México

Las bebidas fermentadas son casi universales entre las sociedades humanas antiguas, el etanol es el compuesto mayoritario y actúa como analgésico, desinfectante, ayuda a preservar e incrementar el valor nutritivo de los alimentos y además es alterador de la conciencia. Por todas estas razones la fermentación ha jugado un papel clave en el desarrollo cultural y tecnológico de la humanidad. En Mesoamérica, los códices y las fuentes de la época colonial describen una variedad de bebidas fermentadas producidas antes del contacto con los europeos. Las bebidas destiladas en contraste, no se habían inventado en todas las culturas y su producción en Mesoamérica pre-hispánica permanece controversial (Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2009¹). Zizumbo-Villarreal *et al.*, (2009²), probaron la hipótesis de Needham *et al.*, (1980), la cual analiza las vasijas de Capacha tipo *bule* y *trífidas* descritas por Kelly, 1974, en el estado de Colima, occidente de México, las cuales pudieron haber sido utilizadas para producir bebidas destiladas. Ellos reprodujeron experimentos usando réplicas de las vasijas, de las técnicas y los materiales (incluyendo el fermento de agave), disponibles en esa región, con lo que obtuvieron resultados exitosos para producir destilados con concentraciones de etanol de entre 20.5 y 35.5 %v/v, simulando las condiciones antiguas de destilación. Con lo cual se observa que la producción de bebidas alcohólicas en México es un proceso que se ha venido desarrollando por miles de años, lo que lo hace ser reconocido por contar con bebidas nacionales por excelencia como el tequila y el mezcal.

México cuenta con la denominación de origen del mezcal, la cual protege la propiedad intelectual de 39 municipios de Durango, 1 de Guanajuato, 81 de Guerrero, 570 de Oaxaca, 58 de San Luis Potosí, 11 de Tamaulipas y 58 de Zacatecas. El estado más recientemente incorporado al plano nacional de productores reservados de mezcal es Michoacán con 29 municipios, incluido en el año 2012. Como ya se ha mencionado anteriormente, esta bebida se encuentra regulada por la Norma Oficial Mexicana: NOM-

070-SCFI-94. El organismo encargado de promover y vigilar el cumplimiento de esta norma es el Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM, 2015; Diario Oficial de la Federación, 2012).

Para cumplir los requisitos oficiales de calidad, se requiere realizar las operaciones higiénicamente en la envasadora y homogeneizadora, garantizar el origen del producto, cuidar su calidad química, lo que tiene que ver, con proteger al Mezcal de su posible adulteración y garantizar las características del tipo de Mezcal y de la marca, las cuales legalmente forman parte de una huella cromatográfica, con lo que se certifica la calidad del producto. De manera general, el proceso de certificación consiste en que el COMERCAM emite el certificado NOM con vigencia de seis meses. El organismo vigila el cumplimiento de la NOM, y si los reportes de verificación de pruebas de laboratorio indican el cumplimiento de la Norma, el certificado se renueva automáticamente por 6 meses más, cubriendo el pago respectivo (Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial, Dirección Ejecutiva de Análisis Sectorial, 2011).

Producción y exportación de mezcal

De acuerdo con cifras del COMERCAM, México cuenta con cerca de 330,000 hectáreas de agave en explotación, propiedad de 9,000 productores, esta actividad genera 29,000 empleos directos e indirectos. En el Maguey-Mezcal actualizado en 2006, se señala la existencia de 625 fábricas, 80 plantas envasadoras y 130 marcas de mezcal. Para 2014 el número de marcas registradas ascendió a 362 y la producción de mezcal aumentó un 48% en los últimos 3 años (figura 1). Existen 526 asociados a COMERCAM, siendo 494 productores de mezcal y 301 productores de agave (COMERCAM, 2015). Oaxaca es el estado con mayor producción de mezcal, con un 93.7 % de la producción total en 2014 seguido por Zacatecas con una producción de 4.4 %. Siendo la mayor producción (77 %) elaborada con *A. angustifolia*. El total de litros de mezcal envasado para mercado nacional aumentó 242 % en 2014, presentando un total de 924, 686 litros de mezcal (97 % tipo (I) y 3 % tipo (II)). Oaxaca también tiene la preponderancia con un 78.2 % del total de mezcal envasado en México. En cuanto a la tendencia de ventas a nivel nacional, esta se concentra mayormente en la región del Valle de México (Distrito Federal y 12 municipios del Estado de México), en los últimos 3 años, el mezcal se ubica en el primer lugar del promedio de crecimiento compuesto con un equivalente al 54.7 %.

El Mezcal presenta un ascenso en las cumbres internacionales y sus estadísticas son prometedoras. En los próximos años se espera consolidarlas como tendencia y no sólo como una moda, para lograrlo es necesario prepararse en todos los ámbitos y estar a la altura de lo que el consumidor nacional e internacional exige: autenticidad, identidad, cultura, sustentabilidad y calidad

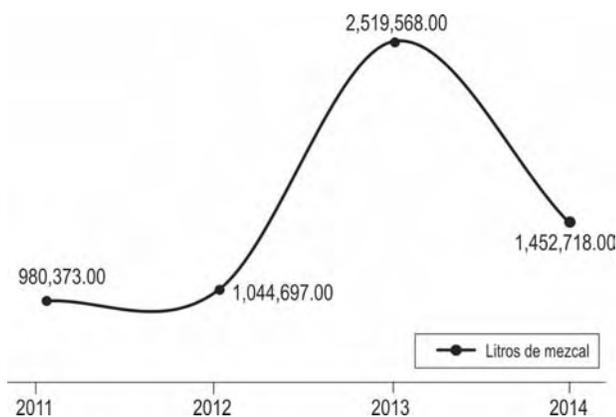


Figura 1. Vol. Mezcal tipo (l) referidos a 45% Alc. Vol. Tomado y modificado de: COMERCAM, 2015.

(COMERCAM, 2015). En el año 2009, las exportaciones totales de la agroindustria en México ascendieron a 7.7 mil millones de dólares, la cerveza fue el producto con mayores ventas, representó el 8.7 % del total exportado, los productos que le siguieron en importancia fueron el tequila y mezcal, con el 7.1 % y 6.5 %, respectivamente (Plan Rector Maguey-Mezcal, 2006). Para 2015 el mercado de exportación de mezcal envasado aumentó 79 % con 116 marcas (figura 2), en su mayoría mezcal tipo (l) (90 % joven, 9 % reposado y 1 % añejo), las cuales se exportan a 42 países, siendo los principales: Estados Unidos, Chile, España, Australia, Inglaterra, Perú, Francia, Alemania, Canadá y Suecia. El 96.1 % de las exportaciones las realiza el estado de Oaxaca (tabla 1) (COMERCAM, 2015).

El mezcal

“Mezcal” es el nombre genérico que viene del náhuatl *mexcalli* que significa agave horneado, es el nombre aplicado a la bebida alcohólica destilada producida en muchas áreas rurales de México. Esta bebida es obtenida de los azúcares fermentados de las cabezas cocidas de más de 50 especies del género *Agave* comúnmente llamado maguey, la cual se produce en aproximadamente 26 estados de México (Aguirre y Eguiarte, 2013; Torres *et al.*, 2015). El proceso de producción del mezcal comienza con la cosecha del agave maduro, entre los 10 y 25 años en especies grandes y entre 4 y 5 años en las especies pequeñas (García-Mendoza, 2007), en esta etapa las plantas son

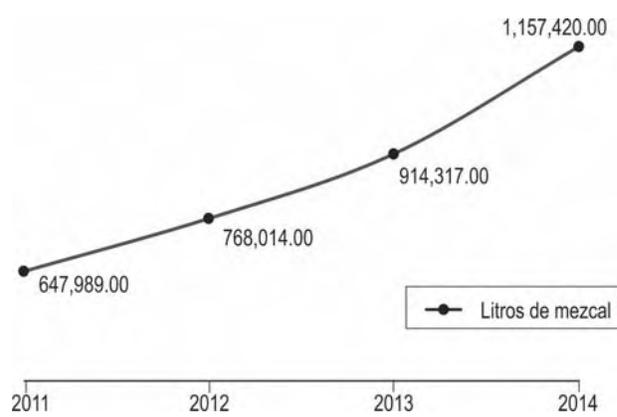


Figura 2. Mezcal envasado para mercado de exportación. Tomado y modificado de: COMERCAM, 2015.

cortadas de su base y la mayor parte de sus hojas son retiradas por medio del jimado, obteniéndose las piñas de agave, las cuales son transportadas al proceso de cocción en hornos o autoclaves. En esta etapa, los polisacáridos, principalmente los de reserva (fructanos), son hidrolizados por la acción de la acidez del jugo y térmicamente para obtener un jarabe rico en fructosa que posteriormente se somete a fermentación alcohólica con levaduras nativas o cepas seleccionadas. Finalmente el mosto con un contenido aproximado de etanol de 2 a 13 % v/v (porcentaje volumen/volumen) se destila para obtener el mezcal blanco o joven.

El mezcal es una bebida muy similar al tequila, de hecho se considera que el tequila es una variedad del mezcal, pero ningún mezcal puede ser un tequila, ya que éste último sólo se elabora de una única especie de agave y recibe exclusivamente este nombre, mientras que el mezcal puede ser elaborado con cualquier tipo de agave siempre y cuando no se encuentre dentro de la denominación de origen para otra bebida. El tequila adquiere su nombre por una de las localidades más productivas de ésta bebida (Tequila, Jalisco, México) y se encuentra industrializado casi en su totalidad, situación que impone la mayor diferencia respecto al mezcal (tabla 2).

Agave: la materia prima

En México, los agaves han tenido una gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas y mestizos, siendo considerados especies clave

Tabla 1. Informe de producción de Mezcal por Estado, 2013.

	Zacatecas	Guerrero	Guanajuato	San Luis Potosí	Durango	Tamaulipas	Michoacán
Envasado Exportación (L)	16, 556	0	2, 971	18, 895	21, 562	3, 274	0
Envasado nacional (L)	35,457	10, 289	10, 174	13, 545	8, 809	3, 488	0
Producción a granel (L)	2,913	8,971	2, 451	0	1, 158	327	1, 319

Fuente: Informe de Actividades, Consejo Regulador del Mezcal, 2015.

en esas regiones, ya que los han aprovechado durante siglos como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras duras, textiles, abono, construcción, implementos agrícolas y principalmente en la producción de diferentes tipos de bebidas alcohólicas como el mezcal y el tequila. Estos pueblos hicieron de México su centro de domesticación y diversificación mediante la selección humana, ya que los seleccionaban por sus fibras, por el aguamiel o las elevadas concentraciones de azúcares. Por todo esto los agaves no sólo tienen su máxima expresión de diversidad morfológica, filogenética y evolutiva en México, sino también cultural, ya que los seres humanos que lo han poblado han sabido aprovechar al máximo los beneficios que producen estas especies (García-Mendoza, 2007; Gentry, 1982; Valenzuela, 1997; Nobel, 1998).

Distribución de los agaves en México

México es el centro de origen de la familia de las Agaveaceas, a la cual pertenece el maguey, incluye 288 especies, 166 de las cuales son magueyes, agrupados en el género *Agave*. En el país se han encontrado 125 especies de agaves, lo que representa el 75 % del total mundial (Cervantes, 2002). Aunque el mayor número se concentra en Oaxaca (23%), Jalisco es el estado con más riqueza en el occidente de México (García-Mendoza et al., 2004). Otra área con mucha riqueza corresponde a la región ubicada en la provincia del Valle de Tehuacán-Cuicatlán con 15 especies, no sólo conserva una gran riqueza de grupos taxonómicos, sino también filogenéticos (García-Mendoza, 2007). Datos más recientes señalan que existen aproximadamente 200 especies de agave de las cuales 150 se encuentran en México, más 36 especies más que pertenecen a categorías infra específicas, lo cual constituye un total de 186 taxones (García-Mendoza, 2007).

La distribución del género abarca del sur de los Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela. Los países con el mayor número de taxones son México, Estados Unidos, Cuba y Guatemala; los demás tienen menos de 8 especies (menos del 3 % del total). Como ya se mencionó en párrafos anteriores, en México se encuentran más del 75 % del género *Agave*, el cual tiene una amplia distribución, sin embargo ésta es altamente asimétrica, hay regiones que poseen más especies que otras. Son muy diversos en las provincias áridas y semiáridas del centro y norte, pero su número disminuye drásticamente hacia las provincias húmedas y cálidas del sur, por lo que su ausencia es notoria en estados como Tabasco, Campeche y Quintana Roo. Son abundantes en las provincias florísticas de las serranías meridionales del centro de México, Sierra Madre Occidental, Altiplano mexicano, península de Baja California y Sierra Madre Oriental (García-Mendoza, 2007).

El subgénero *Agave* está conformado por 103 especies, ocupa un área mayor en la república mexicana, y

sus taxones tienen áreas de distribución más amplias. Una zona con mucha riqueza se ubica en el Valle de Tehuacán (García-Mendoza, 2007), más adelante se realizará un análisis sobre las investigaciones realizadas en estas zonas. El subgénero *Littaea*, constituido por 47 especies, cubre una menor superficie de México y está ausente en las penínsulas de Baja California y Yucatán. El área con mayor diversidad corresponde a la barranca de Metztlán, en el estado de Hidalgo. Los estados más diversos son Oaxaca, con 37 especies, Puebla con 31, Sonora con 30, Querétaro con 26 y Durango con 24 (García-Mendoza, 2007).

Hernández et al. (2007), realizó 20 exploraciones botánicas en zonas representativas del estado de Jalisco. Ellos registraron 23 especies de *Agave*, de las cuales cuatro resultaron ser especies nuevas para la ciencia, siete representaron nuevos registros para el Estado y dos fueron dudosamente identificadas. La mitad de las especies de *Agave* prosperan en bosque de pino y encino, un tercio ocurre en bosque tropical caducifolio. En el estado de Michoacán, la diversidad climática asociada a las características geográficas y morfológicas han favorecido también a la formación de diferentes ecosistemas en los que se desarrollan diversos tipos de vegetación, algunos de ellos permiten la presencia y proliferación de algunas especies del género *agave*, sin embargo, los estudios acerca del mismo género en el estado son escasos y sólo a través de referencias bibliográficas y reportes de estudios botánicos, realizados por varios investigadores durante la primera mitad del siglo XX, entre ellos Lumholtz (1902), Bruman (1938), Foster (1945) y en años posteriores: Gentry (1982), Mc Vaugh (1989) y recientemente Cházaro (2009), quienes exploraron gran parte del territorio del país, particularmente la porción Occidental, comprueban la enorme diversidad y gran potencial de este género, sin embargo, la información documentada es muy escasa acerca de los usos y aprovechamientos que de él se han hecho a través del tiempo en el territorio michoacano (Gallardo et al., 2008).

Así mismo, se pueden citar los estudios de Rodríguez y Espinosa, (1995), quienes inventariaron algunas especies de este género y al respecto hacen referencia que en el estado de Michoacán, existen ocho especies de *Agave*: *Agave angustifolia* Haw, *Agave cupreata* Trel. y *A. Berger*, *Agave filifera* Salm-Dyck, *Agave hookeri* Jacobi, *Agave inaequidens* K. Koch, *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck, *Agave schidigera* Lem y *Agave tequilana* Weber. De esas ocho especies, el *Agave salmiana* (maguey pulquero o verde) y el *Agave tequilana* Weber (maguey azul), que pese a encontrarse en casi la totalidad del territorio estatal no se pueden considerar como nativas, ya que fueron introducidas paulatinamente (Gallardo et al., 2008). En este mismo estado Torres et al., (2015), examinaron la diversidad de las condiciones de riesgo y prácticas de manejo de *A. inaequidens*, ellos estudiaron 5 comunidades a través de 41 entrevistas, mediante las cuales registraron 34 usos diferentes del

A. inaequidens, la más importante fue la producción de mezcal (mencionado por el 76.1 % de los entrevistados). Aproximadamente el 12.5 % sólo lo cosecha pero también realizan prácticas de selección de agaves para producción de semillas, propagación de agaves en viveros, trasplante de las plantas entre otras. El *A. inaequidens* junto con *Agave hookeri* no son exclusivas para bebidas destiladas, antiguamente eran utilizadas el centro de México para la producción de la bebida fermentada pulque, para alimentación y para fibras. Figueredo *et al.*, (2014) analizó los efectos y mecanismos de selección artificial y divergencias fenotípicas entre poblaciones silvestres y manipuladas de *A. inaequidens* y *A. hookeri*, de los cuales el primero se considera silvestre y el segundo solamente se produce mediante su cultivo. Las divergencias fenotípicas entre poblaciones silvestres y domesticadas de *A. inaequidens*, en caracteres asociados a la domesticación y en las de *A. hookeri*, son fenotípicamente similares con *A. inaequidens* cultivado. Ellos analizaron 5 poblaciones salvajes y 5 cultivadas de *A. inaequidens* y 3 poblaciones cultivadas de *A. hookeri*. Analizaron la similitud morfológica y la diferenciación entre plantas y poblaciones mediante métodos multivariantes y ANOVAS. Algunas de las plantas cultivadas de *A. inaequidens* fueron clasificadas como *A. hookeri*, y casi el 10% de *A. hookeri* fue clasificado como *A. inaequidens* cultivado. Las poblaciones silvestres y cultivadas de *A. inaequidens* diferían en 13 caracteres, mientras que las de *A. hookeri* diferían en 23 caracteres respecto a las poblaciones silvestres y sólo 6 caracteres respecto a las poblaciones de *A. inaequidens* cultivadas.

García-Mendoza, (2007) señala que no existe hasta el momento ningún trabajo de clasificación que abarque todas las especies del género agave, afirma que el más reciente fue realizado a nivel infra-genético y lo elaboró Gentry en 1982; sin embargo sus análisis solo incluyen los agaves de Norteamérica. También afirma que Gentry presentó resultados de un intenso trabajo de campo que incluyó colecciones, caracteres morfológicos, variaciones en las poblaciones, complejos taxonómicos, áreas de distribución, hábitat, aspectos fenológicos, usos y presencia de compuestos secun-

darios y con base en esto, se han descrito 15 nuevas especies de varias partes de la república.

El agave y el mezcal

La producción de bebidas fermentadas y destiladas ha sido una práctica realizada desde la antigüedad por muchas culturas en México, lo cual ha despertado el interés para muchos investigadores, quienes han pretendido explicar sus posibles inicios. En el occidente de Mesoamérica prehispánica, se elaboraban alimentos y bebidas alcohólicas fermentadas de agave con alta relevancia cultural y social. Se ha hipotetizado que en el occidente de México la destilación de agave se originó en Colima en la época colonial temprana a través de la adaptación de las técnicas introducidas desde Filipinas (Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2009²). Se han presentado evidencias arqueológicas que confirman la importancia cultural y social de los agaves en Colima en la época precolombina, uno de los fundamentos de los estudios realizados por Zizumbo-Villarreal *et al.*, (2009)¹, quienes analizaron estructuras de piedra circulares en centros residenciales y ceremoniales de ruinas arqueológicas y los compararon con hornos de piedra actuales utilizados para cocer los agaves en la elaboración de bebidas destiladas. Indican que estas estructuras fueron probablemente usadas para preparar alimentos, incluyendo los agaves. Ellos estudiaron además vasijas de cerámica con representaciones de agaves (fase Colima: 400-600 d. C). Exploraron 5 sitios arqueológicos inexplorados y 2 excavados cercanos a los asentamientos arqueológicos estudiados por Kelly, 1980 en los alrededores de la hacienda Capacha y la ciudad de Comala, Colima, México, encontrando evidencia arqueológica que indica un alto significado cultural y social de los agaves en Colima, antes del contacto europeo.

Encuestas realizados por Colunga-García-Marín *et al.* (2007), mostraron que 74 especies de agave se utilizan en México para producir alimentos, bebidas fermentadas o destiladas, fibras y forraje, de las cuales entre 42 y 53 especies se utilizan exclusivamente para la producción de mezcal en 26 estados de México, siendo recolectadas en su mayoría en los bosques (Torres *et al.*, 2015). De las 14 especies de

Tabla 2. Principales diferencias entre el Tequila y el Mezcal.

Tequila	Mezcal
Una especie de agave: <i>Agave tequilana</i> (NOM-006-SCFI-1994)	Varias especies de agave: los más utilizados son <i>Agave angustifolia</i> , <i>Agave esperima</i> , <i>Agave potatorum</i> y <i>Agave salmiana</i> (NOM-070-SCFI-1994)
Proceso tecnificado	Proceso artesanal
Región con denominación de origen reducida (Proceso más estandarizado)	Región con denominación de origen amplia y dispersa (Variabilidad en la elaboración de mezcal en cada región)

agave más utilizadas en la elaboración de mezcal, 2 son cultivadas en plantaciones agroindustriales monoespecíficas: *Agave tequilana* (para la producción de tequila) y *Agave angustifolia* (Aguirre y Eguiarte, 2013). Este último es extensamente cultivado en el estado de Oaxaca y es la fuente de producción de la mayoría del mezcal comercial elaborado en México (Conabio, 2006; Gentry, 1982). Las especies restantes son encontradas en diferentes contextos productivos, que van desde las poblaciones silvestres, hasta los agroecosistemas como son los campos de cultivo. Por lo tanto estos sistemas incorporan la mayor parte de la biodiversidad y el conocimiento tradicional asociado a las bebidas espirituosas de agave (Aguirre y Eguiarte, 2013).

El tequila se prepara de *Agave tequilana* Weber var. azul, el cual no se ha encontrado creciendo en forma silvestre y de hecho, taxonómicamente no es diferente de *Agave angustifolia*, excepto por el mayor tamaño de la hojas, tallos más gruesos y más pesados, panículas difusas con flores largas con tépalos largos en proporción al tubo relativamente corto y al color de las hojas azules en el primero y verde en el segundo (Gentry, 1982). En el caso del mezcal, la especie de agave cambia dependiendo de la región geográfica del país. Oaxaca es uno de los estados donde se trabaja en mayor escala la elaboración de mezcal, y se utiliza generalmente el “magüey espadín” (*Agave angustifolia*) y en menor medida el “magüey tobarische” (*Agave potatorum*) (Cházaro, 2007).

En las montañas de la Sierra Madre del Sur, en el estado de Guerrero, procesan el *Agave cupreata* para elaborar el mezcal. Como esta actividad se ha venido realizando por decenas de años a partir de plantas silvestres que crecen en el bosque de encino, la materia prima ha disminuido drásticamente en los últimos años. A raíz de esto ONG's (organismos no gubernamentales) iniciaron con la siembra de éste agave en viveros, ya que la especie sólo se reproduce sexualmente (por semillas), no produce hijuelos ni bulbillos y los quiotes generalmente son cortados por los campesinos para concentrar los azúcares en las piñas, por lo que no hay propagación natural (Cházaro, 2007). El *Agave cupreata* se cosecha en los bosques secos tropicales, bosques de robles y otros hábitats de las comunidades rurales en la región de Chilapa, Guerrero, México, para la elaboración de mezcal. Los sistemas de gestión locales, utilizan diversas técnicas para regular la cosecha del agave y estimular la generación, incluyendo la exclusión de ganado (Martín et al., 2011). Como es el caso de Martín et al. (2011), quienes estudiaron el impacto de la exclusión de ganado y de los diferentes hábitats respecto a la población y densidad de *A. cupreata*. Realizaron muestreos en pastizales, bosques de encino, bosque seco tropical y bosque mixto de roble-tropical seco, utilizando 54 transectos de 1000 m², donde contaron el agave por tamaño de clase y las mediciones fueron tomadas de la vegetación y el entorno físico.

Los transectos se dividieron en zonas con ganado y ganado excluido en los 4 hábitats. Encontraron que la densidad de agave por 1000 m² fue más elevada en los pastizales, seguidos por los bosques de roble, bosque seco tropical y bosque mixto. Además demostraron que uno de los factores más importantes que influyen en las poblaciones de agave es la presencia de ganado, por el pisoteo o pastoreo de las plántulas y tallos de las flores, lo cual reduce significativamente la densidad de *A. cupreata* de menor tamaño, sin alterar la estructura del tamaño de la planta.

Para producir el mezcal, el agave debe ser cosechado antes de la floración para asegurar que las piñas de la planta tengan alta concentración de azúcares (Bahre & Bradbury, 1980; Illsley et al., 2005). Mientras que unas especies de agave pueden reproducirse por clones, otros no, y la cosecha para la producción de mezcal reduce drásticamente el número de plantas (Jiménez-Valdés et al., 2010). En un estudio de mezcal en Sonora, México, se ha documentado el agotamiento de las poblaciones silvestres de *A. angustifolia*, *A. palmeri* y *A. shrevei* debido a la sobreexplotación (Burwell, 1995). Por tales motivos, en varios estados de México se ha mostrado una creciente preocupación por la explotación desmedida algunas especies de agave, como lo han demostrado Aguirre y Eguiarte (2013). Ellos informan que tanto el *Agave cupreata* y *Agave potatorum* son especies que se distribuyen en los bosques tropicales secos en el sur de México y que la extracción de individuos reproductivos para la producción de bebidas espirituosas ha provocado una disminución de las poblaciones silvestres y han expresado preocupación por su conservación a largo plazo. Ellos evaluaron el grado de la erosión genética de las poblaciones explotadas para proporcionar bases de datos de la genética de poblaciones para el desarrollo sostenible de estrategias de uso de estas especies mediante ISSR (Intersecuencias Simples Repetidas, marcadores nucleares dominantes asociado a los microsatélites). Sus resultados se discuten en relación en el refuerzo *in situ* de poblaciones basadas en semillas de propagación, en contraste las prácticas de micro propagación pueden poner en peligro la diversidad genética de las especies estudiadas teniendo en cuenta los informes anteriores sobre la diversidad genética. Delgado-Lemus et al. (2014), también evaluaron la distribución y abundancia de *A. potatorum* pero en San Luis Potosí, México, ya que la recolección de esta especie en esa región se realiza antes de la reproducción sexual y la sobreexplotación tiene a esta especie en alto riesgo. Ellos evaluaron las tasas de extracción, las prácticas de manejo y la importancia económica para los hogares de San Luis Potosí, para lo cual utilizaron modelos bioclimáticos para proyectar un mapa de distribución potencial de la especie y un muestreo ecológico para estimar la disponibilidad total de agaves cosechables en el territorio. Además realizaron observación participativa, encuestas y entrevistas con los productores de

agave y mezcal en esa región, con lo cual documentaron los usos del agave, aspectos tecnológicos y socioeconómicos de la producción de mezcal y estimaron las tasas de extracción de agaves. Encontrando que en un área de distribución de casi 608 hectáreas se producen anualmente un promedio de 7, 296 plantas cosechables.

La diversidad del germoplasma actual utilizado en la producción de bebidas destiladas a partir de agave en el centro-oeste de México se encuentra en peligro de erosión debido a una expansión en el cultivo del clon de *A. tequilana* Weber var. azul, utilizado para la elaboración del famoso tequila (Colunga-García-Marin, Zizumbo-Villarreal, 2006). Además en los últimos 30 años, el cultivo de esta especie de agave a generado contaminación química, desplazamiento de los cultivos alimentarios tradicionales y variedades tradicionales locales de agave son utilizadas para la preparación de mezcales en el área con denominación de origen para tequila (Zizumbo-Villarreal et al., 2012).

Es por ello que Colunga-García-Marin; Zizumbo-Villarreal, (2006), llevaron a cabo una exploración etnobotánica en el centro y sur del estado de Jalisco, con el propósito de determinar las áreas críticas para la conservación *in situ* de agave y su protección legal, así como para determinar el papel de los cultivos nativos y mestizos locales en la generación y mantenimiento de la diversidad. Al igual que García-Mendoza et al. (2004), sus resultados coinciden en que el núcleo de mayor diversidad de agave en la actualidad se encuentra en el sur de Jalisco, e indican que esto es debido a un proceso continuo de selección iniciada por la población indígena para la producción de alimentos y bebidas fermentadas. Además encontraron más de 20 variantes que fueron cultivadas por agricultores tradicionales, la mayoría relacionadas a la especie *Angustifolia* Haw.

Por otra parte Zizumbo-Villarreal et al. (2012), examinaron las estrategias tradicionales de manejo de recursos genéticos de agave para elaborar mezcal y licores de tequila por comunidades del sur de Jalisco, analizando las bases de manejo sostenible comparado con el sistema industrial del tequila. Encontraron que los destilados del mezcal son preparados con diferentes variedades locales de *A. angustifolia* Haw y *A. rhodacantha* Trel, los cuales son cultivados como cercas dentro de las milpa, el tradicional sistema de cultivos múltiples mesoamericano que permite simultáneamente la producción de agricultura, ganadería y recursos forestales, permitiendo también la producción de mezcal. Sus análisis genéticos y morfológicos indicaron que el manejo tradicional y la selección de variedades locales de *A. angustifolia* puede producir alta diversidad genética (HBT=0.438±0.003) y estructura (hB=0.408) en comparación con las poblaciones silvestres (HBT=0.428±0.015); MP=0.212).

Cada vez es más la demanda de mezcal en México y en otros países del mundo, lo cual ha influido en el riesgo tanto de poblaciones de agave como del mismo mezcal, además de otros factores sociales y ecológicos que también intervienen (Torres et al., 2015). Por ello, es de vital importancia que la cosecha del agave se realice de manera sostenible, permitiendo que las diversas especies de agave tanto silvestres como cultivadas continúen regenerándose para su conservación.

Hidrólisis térmica del Agave

Los fructanos son la principal reserva de polisacáridos de las pantas de agave y se concentran en el tallo y la base de las hojas. Son sintetizados por el metabolismo ácido de las crasuláceas (Cuello et al., 2008) y corresponden a los polímeros u oligómeros formados principalmente de unidades de fructosa unidas a una molécula de sacarosa (Waleckx et al., 2008). En el agave azul y otras especies de agave, mezclas complejas de fructanos grandes ramificados, donde los restos de fructosa están conectados por enlaces β (2→1) y β (2→6), han sido reportados (Waleckx et al., 2008; Waleckx et al., 2011). Las cabezas de agave, que son ricas en fructanos, se cuecen en hornos o autoclaves tradicionales para hidrolizarlos y liberar los azúcares fermentables (monómeros u oligosacáridos con menores grados de polimerización), principalmente fructosa, glucosa, xilosa y maltosa (Cuello et al., 2008). Después de completado el tratamiento térmico, las cabezas de agave son molidas para obtener los jarabes ricos en azúcares fermentables, para que sean susceptibles a la acción microbiana mediante el proceso de fermentación. Cuando las cabezas de agave se cuecen en hornos tradicionales por leña, el proceso tarda de 2 a 3 días. Alternativamente en hornos calentados por vapor de agua a temperaturas cercanas a 100 °C, el proceso de cocción se completa dentro de 8 a 12 horas (Secretaría de economía, 2006). Nattorp et al. (1999), encontró que la despolimerización de los polisacáridos por hidrólisis comienza con la protonación del oxígeno glucosídico, seguido por la rotura del enlace glicosídico, lo que resulta en la formación de un carbocatión cíclico. El carbocatión se estabiliza por un par de electrones en una molécula de agua, y dos nuevas moléculas se forman durante el proceso de despolimerización.

Los furanos. Se han encontrado además una gran cantidad de compuestos químicos generados durante la cocción del agave. Mancilla y López, (2002), supervisaron la producción de compuestos volátiles durante la cocción del agave azul por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) y observaron una gran variedad de compuestos que incluyen alcoholes, aldehídos, ácidos aminados, furanos, ácidos orgánicos, piranos, compuestos de azufre, terpenos y furanonas, así como productos volátiles del tratamiento térmico de agave, tales como alcohol feniletílico, vainillina, α -damascenona y linalol, los cuales son una fuente de

las características organolépticas de tequila (Benn y Peppard, 1996). También se ha estudiado la formación de furanos durante la cocción, estos son derivados de la degradación térmica de las hexosas y pentosas, y el furano más abundante formado durante la cocción de las cabezas de agave es el 5-(hidroximetil) furfural (HMF). Sárvári *et al.* (2003), sugirieron que la capacidad de las levaduras para conferir furanos en compuestos menos tóxicos es un criterio fundamental para la selección de los microorganismos utilizados en la producción de etanol. Además, el furfural, 2-furanmetanol, y ácido 2-furanocarboxílico también son comúnmente producidos durante el tratamiento térmico del agave (Mancilla y López, 2002). Modig *et al.* (2002), encontraron que altas concentraciones de furfural inhibían enzimas esenciales como la piruvato-deshidrogenasa y la aldehído-deshidrogenasa. Bajo condiciones anaeróbicas, las levaduras metabolizan el furfural a alcohol furfúrico; sin embargo, en condiciones aeróbicas, el ácido furanoico es producido y HMF es metabolizado para formar alcohol furfúrico 5-(hidroximetil) (Palmqvist y Hahn, 2000). El furfural y HMF tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las levaduras y la producción de etanol en el proceso fermentativo (Palmqvist y Hahn, 2000). Palmqvist *et al.*, 1999, encontró que la adición de furfural a cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* causa una disminución en la replicación celular sin inhibir la actividad celular (inactivación replicativa). La ausencia de producción de glicerol durante la reducción de furfural sugiere que el furfural actúa como un factor redox alternativo y se oxida el exceso de NADH formado durante la biosíntesis (Botello *et al.*, 2011).

Por otra parte, los estudios realizados por Palmqvist y Hahn, (2000), revelan que la concentración de furfural de 1.922 g/L reduce la velocidad de crecimiento específico de *S. cerevisiae* en un 30 % y además reduce la producción de alcohol un 66 %. A pesar de que una concentración de furfural de 5.093 g/L inhibe completamente el crecimiento celular, concentraciones similares de alcohol furfúrico no afectan significativamente la fermentación. Alternativamente en un estudio llevado a cabo por Choteborská *et al.* (2004), una concentración de furfural de 6.27 g/L y una concentración de HMF de 0.2 g/L no dio lugar a una inhibición significativa.

Las saponinas. La hidrólisis térmica de agave no solamente se realiza en hornos subterráneos a base de piedras y leña, proceso artesanal, sino que también puede realizarse en autoclaves u hornos de mampostería que realizan su función de hidrólisis térmica a base de vapor, aun así se forman compuestos tóxicos que pueden inhibir el crecimiento celular, tal como lo comprobó Zamora *et al.* (2010), quienes analizaron la cocción de agave con vapor, proceso en el que se genera gran cantidad de efluvios ricos en carbohidratos fermentables que regularmente son desechados por la presencia de saponinas, ya que pueden influir de

manera negativa en la fermentación. Ellos obtuvieron muestras de efluvios cada 3 h durante el tiempo de cocción de las cabezas enteras de maguey, y se les midió el pH, temperatura, sólidos totales y abundancia de saponinas por la espuma durante agitación. La concentración de azúcares reductores la obtuvieron por método de Fehling-Soxhlet y por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). La cuantificación de saponinas la realizaron por el método descrito por Baccou, registrando una disminución gradual del pH y la concentración de saponinas, y un incremento en los azúcares reductores. Así como una tendencia similar entre las dos técnicas para saponinas (figura 3).

El tratamiento óptimo de la hidrólisis térmica del agave. Estudios realizados para el tratamiento térmico óptimo de agave también se han desarrollado. Botello *et al.* (2011), estudiaron las cinéticas de la hidrólisis de los fructanos del *Agave salmiana* durante la etapa de cocción de mezcal en un autoclave escala piloto. La hidrólisis térmica la llevaron a cabo en un rango de temperatura de 96 a 116 °C y tiempos de cocción de 20 a 80 h. Sus resultados indicaron que la hidrólisis térmica del agave fue óptima en un rango de temperatura de 106-116 °C con tiempos de cocción de 6-14 h. Las condiciones óptimas correspondieron a una hidrólisis de fructanos del 80 %, produciendo jarabes con concentraciones de furanos y azúcares reductores de 1 ± 0.1 y 110 ± 10 g/L.

La cocción de las cabezas de agave es una reacción heterogénea en una matriz vegetal junto con el calor y el transporte de masa. Modelos rigurosos requieren una comprensión completa y caracterización de las reacciones de depolimerización y degradación, así como ecuaciones de la formulación de calor y transferencia de masa. Las propiedades térmicas de las cabezas de agave son desconocidas pero otros procesos similares se han estudiado mediante el empleo de modelos simplificados que describen los datos experimentales. En estos modelos simplificados, la matriz vegetal se considera que es un sistema homogéneo y sin restricciones de transporte. La hidrólisis y reacciones de degrada-

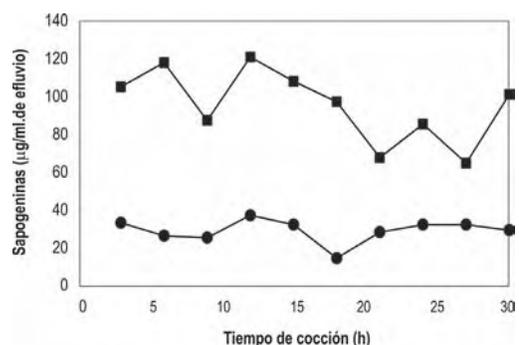


Figura 3. Efecto del tiempo de cocción y la época del año en la concentración de saponinas en los efluvios de maguey *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick. Tomado y modificado de: Zamora, *et al.*, 2010.

ción se consideran reacciones concentradas (Botello et al., 2011).

Durante el proceso de cocción de las piñas de agave, se producen compuestos volátiles, compuestos de Maillard, además de los azúcares fermentables (fructosa y glucosa). Estos compuestos aunados a los producidos durante el proceso de fermentación asociados a la levadura usada o especies levaduriformes presentes pueden tener un impacto significativo sobre las características de la bebida alcohólica (Mancilla y López, 2002; Arrizon y Gschedler, 2006; Díaz, 2008; Pinal et al., 2009).

Aunque el tratamiento térmico de agave es un paso clave en la producción de mezcal, el proceso no ha sido completamente investigado y las relaciones entre las condiciones de funcionamiento, el grado de hidrólisis, la generación de furanos y el efecto de estos en la fermentación no han sido todavía examinados. Por otra parte las Normas Oficiales Mexicanas sobre las bebidas alcohólicas requieren que la concentración de furfural debe ser inferior a 4 mg/100 mL de etanol anhidro (Secretaría de Economía, 2006; Secretaría de Salud, 1996). Para promover la comercialización internacional de mezcal, estas restricciones deben ser estrictamente forzadas (Botello et al., 2011).

Fermentación alcohólica: la conversión de azúcares en compuestos aromáticos

Como en todos los procesos de producción de bebidas alcohólicas, existen variables del proceso que influyen en la productividad y calidad de las bebidas. En el caso de la fermentación, la levadura utilizada en el proceso y el método utilizado, así como el contenido de azúcares y otros componentes adicionados al mosto son variables que influyen en la productividad y características organolépticas finales de la bebida, ya que se produce etanol y otros compuestos, que definen

directamente las principales características del mezcal (López et al., 2012; De León et al., 2008²).

Los microorganismos. En la producción de mezcal, la fermentación espontánea es una práctica común, estas fermentaciones son aquéllas que se producen de forma natural, las realizan las levaduras provenientes de la planta (Agave) y del material de la bodega, sin ningún tipo de inoculación externa. Existen numerosos estudios basados en la identificación de las dinámicas poblacionales responsables de estas fermentaciones (tabla 3), las cuales se ha traducido en un menor rendimiento y calidad sensorial, debido a las variaciones en el proceso de producción entre cada lote, ocasionado por la presencia de varias especies de microorganismos en el mosto como las levaduras y los hongos, así como de bacterias de diversos géneros, las cuales compiten por el consumo de los azúcares del medio, transformándolos en una gran variedad de compuestos orgánicos que generan una disminución en la producción de etanol ocasionando un destilado de baja calidad (Lanchance, 1995; Lappe et al. (2008). Es importante el estudio minucioso de las poblacionales que conforman dichas fermentaciones, ya que es la única forma de conocer la dinámica poblacional propia de una región, con lo cual se lograría utilizar las cepas nativas como iniciadoras de la fermentación en otros procesos y regiones, por encontrarse mejor adaptadas, presentar buenos rendimientos y mediante las cuales es posible conservar las características propias de una región determinada (Kunkee y Amerine, 1970; Ribéreau et al., 1975; Lafon, 1983; Zambonelli, 1988).

Así, en los primeros días de fermentación, los géneros mayoritarios que proliferan son levaduras no convencionales. Después de los primeros días, estos géneros son drásticamente reducidos debido a una supuesta intolerancia al etanol (Kunkee, 1984) y/o a una limitación nutricional (Valle, 2009), dando paso al cre-

Tabla 3. Especies de levaduras encontradas y estudiadas en el proceso de fermentación.

Contribución	Autores
En primeros días de fermentación, proliferan: <i>Hanseniaspora/Kloeckera</i> , <i>Candida</i> y en menor medida <i>Hansenula</i> , <i>Pichia</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Metschnikowia</i> .	Querol et al., (1990); Longo et al., (1991); Fleet y Heard, (1993); Schutz y Gafner, (1994)
Variaciones en los procesos por la presencia de: <i>Saccharomyces</i> , <i>Schizosaccharomyces</i> , <i>Torulaspota</i> , <i>Kluyveromyces</i> y <i>Hanseniaspora</i> , así como de bacterias de diversos géneros.	Lanchance (1995) y Lappe et al., (2008)
<i>Torulaspota delbrueckii</i> , <i>Hanseniaspora</i> spp., <i>K. marxianus</i> proporcionan un progresivo paso a las cepas del género <i>S. cerevisiae</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>Candida milleri</i> y <i>Brettanomyces</i> spp.	Lanchance (1995)
<i>S. cerevisiae</i> muestra elevadas producciones de biomasa y etanol, mientras <i>Kloeckera africana</i> y <i>Kloeckera apiculata</i> , mayor tolerancia al etanol.	Díaz et al., (2008)

cimiento de otras especies más tolerantes al etanol como son las *Saccharomyces*. De hecho es considerada la principal especie responsable de las fermentaciones alcohólicas (Ribéreau, 1985).

Algunos estudios realizados por Fleet *et al.*, (1984); Heard y Fleet (1986), han demostrado que algunas especies de no-*Saccharomyces* también contribuyen durante la fermentación, ya que estas especies sobreviven más de lo que se pensaba inicialmente, pudiendo alcanzar crecimientos significativos que influyen en la composición organoléptica de las bebidas alcohólicas. Son particularmente importantes, ya que sintetizan una gran variedad de compuestos volátiles que contribuyen de manera determinante al bouquet de la bebida (Díaz *et al.*, 2008). Estos tipos de levaduras tienen rendimientos de entre 25 a 49 g/L de etanol pero pueden llegar a producir cantidades de etanol incluso iguales a las del género *Saccharomyces*, siempre y cuando se les cultive en un medio apropiado que cumpla con las características nutricionales y físicas para su óptimo desarrollo (Díaz *et al.*, 2011), por medio de la adición de nutrientes, los cuáles mejoran la eficacia de la fermentación, aumentando el consumo de azúcares reductores y la producción de etanol, en comparación con fermentaciones con ausencia de estos (Díaz *et al.*, 2012). Además, las modificaciones que produzcan éstas en la composición del mosto tendrán un efecto en la cinética de la fermentación y comportamiento bioquímico de *Saccharomyces*. La diversidad, composición y evolución de la microbiota de levaduras presentes en el mosto depende de varios factores como son la localización geográfica, las condiciones climáticas, así como la variedad y madurez del Agave.

Díaz *et al.* (2008), estudió cinco cepas de levaduras aisladas de jugo de agave para evaluar sus capacidades fermentativas y aromáticas. Sus experimentos fueron realizados utilizando jugo de agave suplementado con fosfato de amonio, proceso que es muy común en las destilerías de tequila. Clasificaron tres cepas como *S. cerevisiae*, las cuales mostraron elevadas producciones de biomasa y etanol. También clasificaron a *Kloeckera africana* y *Kloeckera apiculata* como cepas con la mayor tolerancia al etanol, las cuales mostraron un escaso crecimiento. Los resultados encontrados sugirieron que estas cepas se vieron afectadas por una limitación nutricional y/o a compuestos tóxicos presentes en el jugo de agave. Las cepas de *S. cerevisiae* produjeron predominantemente alcohol amílico, isoamílico, n-propanol, 2-feniletanol, ácido succínico, glicerol, metanol, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, acetaldehído e isobutanol. Mientras que las cepas del género *Kloeckera* mostraron una alta producción de ácido acético, 2-fenil acetato de etilo y acetato de etilo. La concentración de metanol fue significativamente diferente entre las levaduras estudiadas. La diversidad entre las 3 cepas de *S. cerevisiae* fue mayor en el perfil aromático que en el nivel genético y el cinético. Por otra parte la diversidad en las cepas del género *Kloeckera* fue me-

nor en cuanto a *S. cerevisiae*, a pesar de pertenecer a dos especies diferentes.

Análisis moleculares. Otros estudios fueron los realizados por Gschaedler *et al.* (2011), quienes caracterizaron el proceso de fermentación del mezcal de San Luis Potosi, México, e identificaron las levaduras presentes en la fermentación utilizando métodos moleculares de cultivos dependientes (RFLP de 5.8S-ITS y secuenciación de los dominios D1/D2), también utilizaron métodos de cultivos independientes (DGGE). Analizaron 2 mostos diferentes obtenidos de *Agave salmiana* e identificaron 192 colonias de levaduras diferentes, las cuales fueron sembradas en placas de agar WL e identificadas por RFLP de ITS-58S-ITS2 del gen de rRNA, con endonucleasas de restricción (*HhaI*, *HaeIII* y *HinfI*). Las cepas identificadas fueron *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kluyveri*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Clavispora lusitanae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida ethanolica* y *Saccharomyces exiguus*, las cuales fueron confirmadas por secuenciación de las regiones D1-D2 de el gen rRNA 26S. Con el método PCR-DGGE las bandas correspondientes a *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *T. delbrueckii* fueron claramente identificadas, confirmando los resultados obtenidos con técnicas clásicas.

Esteve *et al.* (1999), utilizó los patrones de restricción generados a partir de la región que abarca los espaciadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) y el gen rRNA 5.8S para identificar un total de 132 especies de levaduras pertenecientes a 25 géneros diferentes. En muchos casos, el tamaño de los productos de PCR y los patrones de restricción obtenidos con endonucleasas *CfoI*, *HaeIII* y *HinfI* arrojaron un perfil único para cada especie, demostrando que el uso de la técnica "Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción" (RFLP) proponía un nuevo método de rutina rápido y fácil de identificación de levaduras. Técnica que más tarde fue utilizada por González *et al.*, (2012), quien realizó la caracterización molecular y fermentativa de una cepa de levadura aislada de una región productora de mezcal, mediante la técnica RFLP.

La levadura LEVM que había proporcionado un amplificado de 880 pb fue digerida con la enzimas *CfoI* que proporciono tres patrones de restricción uno de ellos de un tamaño de 320 pb y otro de 365 pb y uno de 150 pb, con la enzima *Hae III* generó patrones de 150 pb, 180 pb, 230pb y 320 pb, la enzima *Hinf I* genero un perfil de 365 pb y uno de 155 pb. Comparando dichos perfiles de restricción con los creados en la levadura *S. cerevisiae* 288 C se puede observar que son similares por lo que la levadura LEVM pertenece al género de *S. cerevisiae*.

De la Torre, (2010), también realizó trabajos moleculares sobre microorganismos presentes en fermentaciones para la elaboración de mezcal, él estudió la

dinámica poblacional de las principales especies de levaduras presentes durante la fermentación en medio sintético y medio de mosto, donde analizó la cinética de metabolitos y la sucesión poblacional de cultivos mixtos de aislamientos nativos de *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, y *Torulaspota delbrueckii*. Determinó que el análisis de las fermentaciones con la técnica ARISA (análisis automatizado de los espaciadores intergénicos) permitía obtener patrones diferenciales en los electroferogramas de las 3 especies, representados por picos de diferente tamaño y fluorescencia, demostrando con ello que la técnica puede ser utilizada tanto como un sistema de identificación y etiquetamiento molecular de las especies, así como para verificar que la población deseada se encuentre presente en la fermentación. El análisis de las poblaciones por la técnica FISH (hibridación con fluorescencia *in situ*) le permitió cuantificar la concentración celular de cada una de las especies durante toda la fermentación, y con la cual observó que en las primeras horas de cultivo el crecimiento era similar en las 3 cepas pero también que después de 24 horas *S. cerevisiae* comenzaba a predominar, mientras que las otras especies permanecían viables aunque en baja concentración hasta en final de la fermentación, resultados similares a los planteados por Querol *et al.* (1990), tal como se mencionó en párrafos anteriores.

Análisis cinético. La levadura utilizada en la fermentación está estrechamente relacionada con el contenido de compuestos volátiles en los destilados, tal relación implica el estudio del comportamiento cinético de las cepas seleccionadas ya sea puras o en consorcio. En cuanto a parámetros cinéticos existe una gran cantidad de estudios relacionados, como el caso de Ramírez y Molina (2005), quien estudió el comportamiento cinético de *S. cerevisiae*, ellos encontraron que al aumentar la concentración de levaduras de 50 a 70 millones por mililitro a 28 °C, reducían la fase "lag" en una hora, y que la velocidad específica máxima de crecimiento era de 0.38 h⁻¹, con una constante de saturación de 1.35 g/L, determinaron además un rendimiento de 1.68 para esta cepa. González *et al.* (2012), reportó un crecimiento celular de *Kluyveromyces marxianus* de 3.58x10⁸ cel/mL con una concentración de etanol producido de 12.45 % v/v, al igual que Carbó *et al.* (2008), quien reportó una producción de etanol de 12 a 13 % entre las 24 y 48 horas de fermentación utilizando cultivos mixtos de *Brettanomyces/Dekkera* y *S. cerevisiae*. González *et al.* (2012), también encontraron que para obtener mayores cantidades de etanol el proceso debe aproximarse hacia sustratos intermedios (12 °Brix) utilizando jugo de *Agave cupreata*, y una temperatura de 28 °C aproximadamente. El consumo de sustrato para *K. marxianus* varía de una concentración inicial de 109.5 g/L de azúcares (10 °Brix) llegando a una cantidad final de 9.01 g/L, Díaz *et al.* (2011), obtuvieron valores similares con *Kloeckera africana* y *Agave tequilana* reportando un consumo de sustrato de aproximadamente 105.32 gr/L. Santiago *et al.* (2009), obtu-

vo concentraciones de 4.2x10⁷ a 9.8x10⁷ cél/mL a las 54 horas de fermentación utilizando *Agave potatorum* y 1.6x10⁷ a 2.5 x 10⁷ cél/mL con *Agave angustifolia*. Sin embargo son concentraciones bajas comparadas con las reportadas en el caso del tequila en condiciones rústicas, donde la población alcanza valores de 6 a 15x10⁷ cél/mL (Cedeño, 1995) o en condiciones controladas de 2x10⁷ cél/mL (Arrizon y Gschedler, 2006; Arrizon y Gschedler, 2002).

La optimización del proceso. Otra área de estudio involucrada en las fermentaciones alcohólicas es la optimización del proceso. De León *et al.*, en (2008²), aplicó la metodología de Superficie de Respuesta para optimizar la etapa de fermentación en la producción de mezcal a partir de *Agave salmiana*. Utilizaron un diseño factorial 3k, para obtener modelos que describieran la relación entre la producción de etanol, el proceso de productividad y el rendimiento de producto respecto a la temperatura de fermentación y a la concentración de azúcares, encontrando que las condiciones fermentativas si afectaban la composición de alcoholes superiores en el mezcal y establecieron como condiciones operativas óptimas, 28 °C de temperatura y 105 g/L de azúcares iniciales. Al igual que Pérez *et al.* (2013), quienes estudiaron el comportamiento cinético de biomasa y etanol nivel matraz durante la fermentación alcohólica, donde utilizó jugo de *Agave cupreata* y se establecieron como variables de estudio: tipo de levadura, concentración de azúcares y temperatura, utilizando un diseño Box-Behnken de segundo orden, ellos establecieron como condiciones ideales 28 °C de temperatura, 12 °Brix de azúcares iniciales y la levadura perteneciente al género *K. marxianus*, la cual presentó los mejores rendimientos de etanol.

Otra área relacionada con los procesos fermentativos y de relevante importancia es la planteada por Escalante *et al.* (2009), quienes describieron un algoritmo para el monitoreo continuo de las concentraciones de biomasa y etanol, así como de la velocidad del crecimiento celular durante la fermentación alcohólica para la elaboración de mezcal. El algoritmo desarrolla la función con las mediciones lineales del potencial redox. El procedimiento combina una red neuronal artificial que relaciona el potencial redox de las concentraciones de biomasa y etanol con el algoritmo, el cual utiliza las estimaciones de biomasa para inferir la tasa de crecimiento en la fermentación. Los resultados muestran que el potencial redox es un valioso indicador de la actividad metabólica de los microorganismos en la fermentación del mezcal. Además la tasa de crecimiento estimada puede ser considerada como una evidencia directa de la presencia de cultivos mixtos de microorganismos, sin embargo los datos totales de biomasa no proporcionan una evidencia definitiva de ello. Ellos además presentaron el diseño detallado del software del sensor utilizado, así como su aplicación experimental nivel laboratorio.

Análisis químico del mezcal: la composición de compuestos volátiles de la bebida

El aroma y sabor de las bebidas alcohólicas (cerveza, vino, tequila y mezcal), son el resultado de numerosos compuestos volátiles y no volátiles producidos en varias etapas del proceso de producción, cuya mezcla compleja define sus atributos organolépticos, sensoriales y la aceptación por el consumidor (López, 1999; Vallejo y González, 2000; Vallejo *et al.*, 2004; Cole y Noble, 2003). Aunque se sugiere que en su mayoría son producidos principalmente por la o las levaduras contenidas naturalmente o adicionadas en la fermentación del mosto de agave (Díaz *et al.*, 2008) pueden también estar contenidos en la materia prima y variar entre especies, regiones geográficas y entre condiciones climáticas del cultivo; por otra parte pueden generarse por las características del mosto y las condiciones del proceso, o durante la maduración del producto (Cole y Noble, 2003). Por tal motivo la composición de la comunidad microbiana es un factor clave en la calidad aromática de las bebidas fermentadas (López *et al.*, 2012; Benn y Peppard, 1996) y una vez destilado el mosto, se requiere del análisis químico de sus componentes volátiles, este representa un problema analítico complejo, desde su aislamiento, caracterización e interpretación (Botello *et al.*, 2007).

El mezcal es una bebida que al igual que todas las bebidas fermentadas o destiladas tienen determinado grado alcohólico y una gran variedad de compuestos aromáticos que le confieren las características sensoriales que lo diferencian de las demás. Esta bebida se encuentra regulada por la Norma Oficial Mexicana (NOM-070-SCFI-94), la cual se apega sus formas tradicionales de producción, incidiendo en el control de la calidad, higiene y legitimidad del producto; también señala los requisitos para su producción, estableciendo las características y especificaciones que deben

cumplir los usuarios autorizados para producir y/o comercializar la bebida. La norma reguladora del mezcal no se encuentra actualizada y las especificaciones que establece no son tan estrictas como las que especifica la norma reguladora del Tequila (NOM-006-SCFI-2005), esto quizá por el motivo de que la mayoría de los productores de mezcal cuentan con sistemas artesanales para conducir sus procesos y difícilmente pueden lograr cumplir con la normatividad vigente mientras no estandaricen sus procesos. Se muestran a continuación (tabla 4) las diferencias entre ambas normas.

El contenido de metales ha sido reportado como un parámetro de calidad en relación a la autenticidad de bebidas destiladas y no destiladas. Sin embargo la mayoría de los productores utilizan alambiques de cobre como equipo de destilación, otros más utilizan aleaciones de cobre y acero o sólo de madera. Lo anterior indica un alto grado en cuanto al uso del cobre, y la NOM-SSA1-142-1995 (que señala máximo 2 mg de cobre/L) no es adecuada, ya que la mayoría de los productos obtenidos, con el método tradicional presentan concentraciones de cobre superiores a las permitidas por dicha normativa.

Se han identificado componentes en el mezcal que por su naturaleza química se clasifican en acetales, ácidos orgánicos, alcoholes, cetonas, aldehídos, ésteres, fenoles y terpenos, siendo los grupos más abundantes en constituyentes y presencia el metanol, alcoholes superiores y ácidos (Lanchenmeier *et al.*, 2006; De León *et al.*, 2008¹; Botello *et al.*, 2007) que pueden llegar a ser tóxicos y están regidos por las normas oficiales mexicanas. Los compuestos con concentraciones más bajas son los esterres, aldehídos, cetonas, ácidos, furanos y terpenos (López, 1999; López y Guevara, 2001; De León *et al.*, 2008¹), que contribuyen al aroma del mezcal. Por su parte el furfural representa un indicador

Tabla 4. Especificaciones de las normas reguladoras del tequila y mezcal.

Determinación	Mezcal	Tequila
% de Alcohol	NMX-V-013	NMX-V-013-NORMEX-2005
Alcoholes superiores	NMX-014-S	NMX-V-005-NORMEX-2005
Extracto seco y cenizas	NMX-V-017	NNM-V-017-NORMEX-2005
Metanol	NMX-V-021	NMX-V-005-NORMEX-2005
Etiqueta	NOM-030-SCFI	NMX-V-049-NORMEX-2004
Furfural	---	NMX-V-004-NORMEX-2005
Aldehídos y ésteres	---	NMX-V-005-NORMEX-2005
Azúcares reductores	---	NMX-V-006-NORMEX-2005
Muestreo	NMX-Z-012	---
Minerales	---	NOM-117-SSA1-1994
Prácticas de higiene y sanidad	---	NOM-120-SSA-1994
Salud ambiental, Agua para uso	---	NOM-127-SSA1-1994

para comprobar que la bebida se obtuvo a partir de agave como materia prima (Gallardo *et al.*, 2008).

Se han identificado aproximadamente 800 componentes en vinos mediante técnicas de detección olfatométrica y cromatografía de gases, de los cuales, se han identificado de 40 a 50 compuestos como los principales agentes responsables de la producción de aromas (Ferreira *et al.*, 2002). Por otra parte algunos estudios han descrito la caracterización de los compuestos volátiles contenidos en el tequila, donde alrededor de 175 diferentes compuestos han sido identificados y se ha observado un alto contenido en alcoholes superiores junto con bajas concentraciones de ésteres, acetales, terpenos, furanos, ácidos, aldehídos, cetonas, fenoles y sulfuros. Se ha reportado que algunas especies de *no-Saccharomyces* tales como *Kloeckera spp.* y *Hanseniaspora uvarum* son conocidas por su aporte en la calidad de volátiles (Benn y Peppard, 1996). La caracterización de la composición de estas bebidas ofrece ventajas en su procesamiento y en sus propiedades sensoriales finales, en la selección de cepas de levaduras por la producción de terpenos (Carrau *et al.*, 2005), en la selección de barricas para los procesos de reposo y añejamiento (Waterhouse y Towey, 1994) y en el efecto de la región de cultivo de la materia prima sobre el contenido de odorantes importantes (Arrhenius *et al.*, 1996). Se presentan a continuación (tabla 5) algunos compuestos mayoritarios encontrados por López *et al.*, 2012, en tequila utilizando dos cepas de levaduras.

Tabla 5. Comparación de compuestos mayoritarios contenidos en el Tequila blanco de 55 °Alc. vol., elaborado a nivel industrial, con dos levaduras distintas: *K. marxianus* UMPe-1 y *S. cerevisiae* Pan 1.

	Compuesto (mg/100 mL)	
	<i>K. marxianus</i> UMPe-1	<i>S. cerevisiae</i> Pan1
Etanol	No cuantificado	No cuantificado
N-Propanol	75	20
Isobutanol	115	30
Alcohol isoamílico	306	50
2-Pentanol	76	10
Metanol	314	350
Acetaldehído	7.4	10
n-Butanol	2	12
Acetato de etilo	2.6	15
Lactato de etilo	3	20

Los estudios de Botello *et al.* (2007), se basan en el análisis químico del mezcal, los cuales analizan un conjunto de diez mezcales comerciales diferentes me-

dante extracción líquido-líquido con diclorometano y concentrado del extracto orgánico por evaporación. El análisis de los extractos lo realizaron por cromatografía de gases y espectrofotometría de masas (GC-MS). Identificaron 85 componentes, además identificaron 30 componentes más previamente reportados en la literatura como importantes descriptores de aromas en bebidas alcohólicas. Reportaron concentraciones de cetonas de 1.187 %, ésteres de 17.512 %, alcoholes de 63.54 %, ácidos de 7.685 %, aldehídos de 0.055 %, furanos de 1.930 %, terpenoides de 1.043 %, fenoles de 0.528 % y acetales de 6.511 % aproximadamente. Se muestra un resumen de los porcentajes promedio de áreas por familias químicas encontradas por Botello *et al.* (2007), en Mezcal (tabla 6), comparadas con las reportadas por Benn y Peppard, (1996) en un extracto orgánico de tequila. De León *et al.* (2008)¹, no sólo analizó la caracterización de compuestos volátiles del mezcal, sino también analizaron otras bebidas alcohólicas étnicas de agave como la raicilla, sisal, tequila, bacanora, sotol y pulque por cromatografía de gases-microextracción en fase sólida de espacio de cabeza-cromatografía de gases-espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS) (tabla 7). Identificaron 105 compuestos, de los cuales 11 fueron clasificados como compuestos mayoritarios y los demás como compuestos minoritarios. Diecisiete de los compuestos minoritarios pueden ser utilizados como marcadores de autenticidad por ser específicos de este tipo de bebidas. Ellos indican que diecisiete de estos últimos compuestos pueden ser utilizados como marcadores de la autenticidad ya que son específicos de estas bebidas. El análisis de conglomerados (AC) mostró que las bebidas alcohólicas de agave se pueden distinguir por el análisis multivariado de los compuestos mayoritarios, sin embargo, el análisis de compuestos minoritarios proporcionan una mejor toma de huellas dactilares. En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en sus estudios.

Tabla 6. Porcentajes de área por familias químicas obtenidas por Cromatografía de gases.

Familia	Mezcal	Tequila (Benn y Peppard, 1996)
	(% Área)	(% Área)
Cetonas	1,187	0,2
Ésteres	17,51	3,85
Alcoholes	63,54	88,45
Ácidos	7,68	1,3
Aldehídos	0,05	0,03
Furanos	1,93	0,85
Terpenoides	1,04	0,64
Fenoles	0,53	0,13
Acetales	6,51	3,15

Como ya se ha mencionado anteriormente, la gran mayoría de los compuestos volátiles están asociados con las especies de levaduras presentes en los mostos de fermentación, por tal motivo varios investigadores han desarrollado estudios relacionadas entre la cepa y los compuestos volátiles producidos, tal es el caso de López *et al.* (2012), quienes realizaron un análisis comparativo del rendimiento y el contenido de compuestos volátiles producidos durante la fermentación de mostos de agave para tequila, utilizando una levadura aislada de ambientes naturales perteneciente al género *K. marxianus* y otra del género *S. cerevisiae*. Ellos encontraron con *K. marxianus* una velocidad máxima de consumo de azúcares fermentables de 4.79 g/L*h y una producción de etanol de 2.32 g/L*h, acumulando 54.2 g de etanol/L de mosto después de 72 horas de fermentación; mientras que para la levadura *S. cerevisiae* la riqueza alcohólica acumulada fue de 39.4 g de etanol/L. Los rendimientos de producción alcohólica obtenidos con respecto a la concentración de azúcares fermentables, correspondieron a 96 % para *K. marxianus* y 70 % para *S. cerevisiae*. También identificaron 29 compuestos volátiles en el tequila con *K. marxianus* (por GC-MS), mientras *S. cerevisiae* presentó menor número de compuestos y en menor concentración. Sus resultados sugirieron que la cepa *K. marxianus* es una levadura adecuada para la fermentación, contribuyendo con el mejoramiento de las características organolépticas de la bebida. Estudios similares realizados por Pérez *et al.* (2013), muestran resultados con concentración de etanol en una muestra destilada de mezcal de 46.75 % y un 1.88 % de metanol utilizando la cepa

K. marxianus y *Agave cupreata*. Valores similares a los reportados por Díaz *et al.*, 2012, con una concentración de etanol de 30-45 %, utilizando *Agave tequilana* y cepas de levadura *Kloeckera africana*.

Conclusiones

Las bebidas alcohólicas como el mezcal presentan una amplia variabilidad en su composición química y propiedades sensoriales, esto como resultado del inmenso número de microorganismos que pueden participar en el proceso de fermentación (natural o espontánea) con o sin la adición de otros azúcares permitidos por la norma reguladora; así como por la gran diversidad de especies de agave utilizados; por los diferentes métodos para llevar a cabo la hidrólisis térmica del agave; por las diferentes prácticas locales del proceso de destilación y rectificación; por el proceso reposo o añejamiento y por la denominación de origen que se encuentra muy dispersa en el territorio mexicano, contrario al tequila que es la bebida con menor variabilidad por ser producida de una única especie de agave y contar con un proceso industrializado. Todo esto aunado a la falta de estandarización de los procesos, por ser en su mayoría conducidos por sistemas tradicionales, involucra que no existan estudios concretos sobre un proceso o producto específico que permita la mejora de las etapas de producción. Existe además escasa información sobre el análisis de bebidas artesanales como el mezcal, la poca información disponible es un importante antecedente de los logros y avances que se han realizado y que comenzarán a surgir en

Tabla 7. Concentración de compuestos mayoritarios encontrados en bebidas alcohólicas producidas de diferentes especies de agave.

Compuesto	T.R. (min)	γ /(mg/L)									
		Mezcal de <i>A. angustifolia</i>	Mezcal de <i>A. duranuensis</i>	Mezcal de <i>A. potatorum</i>	Mezcal de <i>A. salmiana</i>	Bacanora	Raicilla	Sisal	Sotol	Tequila	Pulque
Acetato de etilo	4,46	395±3	474±6	492±1	170±0	284±5	166±1	100±2	323±2	221±2	270±5
Metanol	4,63	1024±6	942±3	472±1	1162±4	1065±2	217±3	1826±11	805±7	880±7	ND
Etanol	5,3	307700	370000	290000	307000	339000	315000	307000	315000	362000	39000
2-Butanol	6,66	21±0	17±0	ND	59±0	ND	ND	ND	ND	ND	47±1
Propanol	6,91	612±2	580±1	97±0	708±2	111±0	41±1	163±1	99±1	208±8	ND
2-Methylpropanol	7,87	201±1	307±0	321±0	126±0	294±2	83±1	172±0	50±0	340±1	218±4
1-Butanol	8,64	21±1	22±3	13±2	14±1	ND	ND	ND	35±1	ND	ND
2-(3)-Metil-1-butanol	9,62	472±0	1064±2	589±1	307±1	926±1	350±3	545±1	83±0	1068±10	65±1
Etil-2-hydroxipropanoato	11,72	124±2	265±3	73±1	189±2	ND	ND	ND	ND	77±1	85±2
Ácido acético	13,26	939±6	1192±25	1042±29	638±8	207±2	160±6	441±55	ND	214±47	1530±19
2-Feniletanol	18,82	14±1	18±0	17±0	10±2	23±0	16±1	9±0	ND	23±0.5	64±0
Alcoholes superiores	-	1339±4	2007±1	1037±2	1220±5	1354±1	490±4	888±2	267±1	1638±13	394±4

Fuente: De León *et al.*, 2008.

esta área de investigación como resultado de la actual y creciente demanda de este tipo de bebidas y de su regulación para llevar al mercado nacional e internacional un producto de calidad. Lo importante no sólo es conocer los compuestos mayoritarios como lo plantea Botello et al. (2007), cuya presencia está reglamentada, sino también aquellos componentes minoritarios que confieren una huella distintiva de cada producto, propia de un agave, de una región, de un procesamiento; que permita elucidar pruebas de autenticidad y diferenciación de las distintas zonas mezcaleras. Esta variabilidad no debe considerarse como sinónimo de falta de calidad, sino como la expresión de particularidades propias y distintivas de cada región productora de mezcal. Motivo por el cual es de vital importancia estudiar los compuestos que constituyen el mapa químico de cada mezcal, los microorganismos de los que derivan estos compuestos, el tipo de agave utilizado y el proceso local empleado en su elaboración para así tener el conocimiento necesario que permita caracterizar apropiadamente los diferentes mezcals producidos en México. También es importante que se realicen prácticas de manejo sustentables en la cosecha del agave, permitiendo que las especies continúen regenerándose, ya que actualmente existe una preocupación por preservar las diferentes especies de agave silvestre y cultivado que está siendo explotado sin medidas de control alguno y se pone en riesgo su conservación. Esto a consecuencia del creciente comercio del mezcal para el mercado nacional y para exportación, lo que da lugar a la intensificación en la extracción de agave. Es importante por ello, que la producción de mezcal se realice mediante procesos sustentables, lo cual exige grandes cambios en la cadena productiva y la adopción de nuevas innovaciones científicas y tecnológicas.

Referencias bibliográficas

- Aguirre, D., Eguiarte, L. (2013). Genetic diversity, conservation and sustainable use of *Wilde Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in Mexico. *Journal of Arid Environments*, 90, 36-44.
- Arrhenius, P., McCloskey, P., Sylvan, M. (1996). Chemical Markers for aroma of *Vitis vinifera* Var. Chardonnay Regional Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (4), 1085-1090.
- Arrizon, J., Gschaedler, A. (2002). Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of the tequila fermentation process. *Canadian Journal of Microbiology*, 48 (11), 965-970.
- Arrizon, J., Gschaedler, A. (2006). Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration. *Journal of Applied Microbiology*, 102 (4), 1123-1131.
- Bahre, J., Bradbury, E. (1980). Manufacture of mezcal in Sonora, Mexico. *Economic Botany*, 34, 391-400.
- Benn, M., Peppard, L. (1996). Characterization of Tequila Flavor by Instrumental and Sensory Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (2), 557-566.
- Botello, J., Cárdenas, M., Estrada, A., Molina, J., Jiménez, H., Navarrete, J., Rico, R. (2007). Compuestos volátiles en el mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6 (1), 41-50.
- Botello, J., García, M., Jiménez, H., Navarrete, J., Rico, R., Miranda, R. (2011). Kinetic study of the thermal hydrolysis of *Agave salmiana* for mezcal production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (13), 7333-7340.
- Bruman, J., (1983). Genetic Aspects of Plant Introduction. *The Scientific Monthly*, 46 (2), 120-131.
- Burwell, T. (1995). Bootlegging on a desert mountain: the political ecology of *Agave (Agave spp.)* demographic change in the Sonora River Valley, Sonora, Mexico. *Human Ecology*, 23, 407-432.
- Carrau, M., Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gaggero, C., Dellacasa, E., Versini, B., Henschke, P. (2005). De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. *FEMS Microbiology Letters*, 243 (1), 107-115.
- Cedeño, M. (1995). Tequila Production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 15, 1-11.
- Cervantes, M. (2002). Plantas de importancia económica en las zonas áridas y semiáridas de México. México: UNAM, Instituto de Geografía. [Versión electrónica]. Recuperado de: URL (<https://books.google.com.mx>), pp. 63-66, 73.
- Cházaro, M., Valencia, O., Hernández, M. (2007). Agaves silvestres usados en la elaboración de bebidas alcohólicas. Agaves del Occidente de México. Guadalajara, México: CUCBA-CUCSH, [Versión electrónica], pp. 123-126.
- Cházaro, M. (2002). Antología Botánica Del Occidente de México. Universidad de Guadalajara, Departamento de Geografía y Ordenación Territorial, pp. 35-79.
- Choteborská, P., Palmarola, B., Galbe, M., Zacchi, G., Melzoch, K., Rychtera, M. (2004). Processing of wheat bran to sugar solution. *Journal of Food Engineering*, 61 (4), 561-565.
- Cole, C., Noble, C. (2003). Flavor chemistry. In: Fermented Beverage Production. New York, United States: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 393-396.
- Colunga-GarcíaMarín, P., Zizumbo-Villarreal, D. (2006). Tequila and other agave spirits from west-central México: Current germplasm diversity, conservation and origin. *Biodiversity and Conservation*, 16, 1653-1667.
- Colunga-GarcíaMarín, P., Zizumbo-Villarreal, D., Martínez, J. (2007). Tradiciones en el aprovechamiento de los agaves mexicanos: una aportación a la protección legal y conservación de su diversidad biológica y cultural. In: Colunga-GarcíaMarín, P., Larqué, A., Eguiarte, L.E. and Zizumbo-Villarreal, D. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcals y otros agaves. México: CICY, CONACYT, CONABIO, INE, p 229-248.
- COMERCAM (Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal). (2015). Informe de actividades.
- Conabio. (2006). Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. México, D.F.: Redacta, S.A. de C.V, p 5-70.
- Cuello, C., Juárez, B., Aguirre, J., Pinos, J. (2008). Quantitative characterization of non-structural carbohydrates of mezcal *Agave (Agave salmiana Otto ex. Salm-Dick)*. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 56 (14), 5753-5760.
- De León, A., Escalante, P., Jiménez, M., Ordoñez, L., Flores, J., Barba, A. (2008¹). Characterization of Volatile Compounds from Ethnic Agave Alcoholic Beverages by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Food Technology*, 46 (4), 448-455.
- De León, A., Escalante, P., Barba de la Rosa, A., Blaschek, H. (2008²). Optimization of fermentation conditions for the production of the mezcal from *Agave salmiana* using response surface methodology. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 47 (1), 76-82.
- Delgado-Lemus, A., Casas, A., Téllez, O. (2014). Distribution, abundance and traditional management of *Agave potatorum* in the Tehuacán Valley, Mexico: bases for sustainable use of non-timber forest products. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10, 63.
- Diario Oficial de la Federación. (2012). Alejandro López González, Director General adjunto, Secretaría de Gobernación, www.dof.gob.mx.

- Díaz, D., Marie, D., Estarrón, M., Strehaiano, P. (2008). Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from Agave tequilana Weber juice. *International peer-reviewed journal Enzyme and Microbial Technology*, 42 (7), 608-616.
- Díaz, D., Córdova, J., Valle, J. (2011). Efecto interactivo de las fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico en la fermentación de jugo de agave con *Kloeckera africana*. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. Acapulco Guerrero, México.
- Díaz, D., Valle, J., Córdova, J., Estarrón, M., Hernández, G. (2012). Fermentation of Agave tequilana juice by *Kloeckera africana*: influence of amino-acid supplementations. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101 (2), 195-204.
- Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial, Dirección Ejecutiva de Análisis Sectorial. (2011). México, pp 1-5.
- Escalante, P., Ibarra, V., Rosu, H., De León, A., González, R. (2009). Online monitoring of mezcäl fermentation based on redox potential measurements. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32 (1), 47-52.
- Esteve, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49 (1), 329-37.
- Ferreira, V., Ortian, N., Escudero, A., Loapez, R., Cacho, J. (2002). Chemical characterization of the aroma of grenade rose wines. Aroma Extract Dilution Analysis, quantitative determination and sensory reconstitution studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (14), 4048-4054.
- Figueredo, C., Casas, A., Colunga-GarcíaMarín, P., Jafet, M., González-Rodríguez, A. (2014). Morphological variation, management and domestication of 'maguey alto' (*Agave inaequidens*) and 'maguey manso' (*A. hookeri*) in Michoacán, México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10 (66), 1-12.
- Fleet, H., Lafon, S., Ribéreau, P. (1984). Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Applied Environ Microbiology*, 48, 1034-1038.
- Foster, M. (1945). Sierra Popoluca Folklore and Beliefs. *American Archaeology and Ethnology*, 42, 177-250.
- García-Mendoza, A. (2007). Los agaves de México. *Ciencias, Universidad Autónoma de México*. 087: 14-23.
- García-Mendoza, A., Ordóñez, M., Briones, M. (2004). Agaváceas. Biodiversidad de Oaxaca, pp. 159-169.
- Gallardo, J., Gschaedler, C., Cházaro, M., Tapia, E., Villanueva, S., Salado, J. H., Villegas, E., Medina, R., Aguirre, M., Vallejo, M. (2008). La producción de mezcäl en el estado de Michoacán. Gobierno del Estado de Michoacán y Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica y Diseño del Estado de Jalisco. Michoacán, México, pp. 90-96.
- Gentry, H. (1982). Agaves of Continental North America. Arizona, Estados Unidos: University of Arizona Press, pp. 25-47, 670.
- González, J. C., Damián, R. M., Pérez, E., Chávez, M. C. (2012). Isolation, molecular and fermentative characterization of a yeast used in ethanol production during mezcäl elaboration. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11 (3), 389-400.
- Gschaedler, A., Verdugo, A., Segura, L., Kirchmayr, M., Ramírez, P., González, A., Coria, R. (2011). Yeast communities associated with artisanal mezcäl fermentations from Agave salmiana. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100 (4), 497-506.
- Heard, M., Fleet, H. (1986). Occurrence and growth of yeast species during fermentation of some Australian wines. *Food technology in Australia*, 38, 22-25.
- Hernández, G., Cházaro, M., Flores, E. (2007). Inventario, distribución y hábitat del género Agave en Jalisco, Agaves del Occidente de México. Guadalajara, México: CUCBA-CUCSH, p 6-12.
- Illsley, C., Tlacotempa, A., Rivera, G., Morales, P., García, J., Casarrubias, L., Calzada, M., Calzada, R., Carranca, C., Flores, J., Omar, E. (2005). Maguey papalote: para todo mal, mezcäl; para todo bien, también. La riqueza de los bosques mexicanos: más allá de la madera. SEMARNAT, México.
- Kelly, I. (1974). Stirrup Pots from Colima: Some Implications in B. Bell, ed. The Archaeology of West Mexico. Ajijic, Jalisco: Sociedad de Estudios Avanzados de Occidente, pp 206-211.
- Kunkee, E., Amerine, M. (1970). Yeasts in winemaking. In: The Yeasts Technology. Academic Press, London: A.H. Rose and J.S. Harrison, p. 5-72.
- Kunkee, E. (1984). Selection and modification of yeasts and lactic acid bacteria for wine fermentation. *Food Microbiology*, 1 (4), 315-332.
- Lafon, S. (1983). Wine and brandy. In Biotechnology. Weinheim, Verlag, Chemie: H.H. Rehm y G. Reed, p 81-163.
- Lachance, M. (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 68, 151-160.
- Lachenmeier, W., Sohnius, M., López, G. (2006). Quantification of selected volatile constituents and anions in mexican Agave spirits (tequila, mezcäl, sotol and bacanora). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (11), 3911-3915.
- Lappe, R., Moreno, R., Arrizón, J., Herrera, T., García, A., Gschaedler, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research*, 8 (7), 1037-1052.
- López, M. C. (1999). Tequila Aroma. In: Flavor Chemistry of Ethnic Foods. New York, United States: Edited by Shahidi, and Kluwer Academic, p 211-217.
- López, M., Guevara, Y. (2001). Authenticity of three mexican alcoholic beverages by SPME-GCMS. New Orleans, L. A: Annual Meeting of Institute of Food Technologists, p 10-3.
- López, A., Díaz, P., Campos, G. (2012). Estudio comparativo de rendimiento y contenido de compuestos volátiles en un proceso de elaboración de Tequila a nivel industrial. *Ciencia Nicolaita*, 57, 41-52.
- Lumholtz, C. (1902). Unknown Mexico. 2v. New York.
- Mancilla, N., López, M. (2002). Generation of Maillard compounds from inulin during the thermal processing of Agave tequilana Weber Var. Azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (4), 806-812.
- Martin, M., Peters, C., Palmer, M., Illsley, C. (2011). Effect of habitat and grazing on the regeneration of wild Agave cupreata in Guerrero, Mexico. *Forest Ecology and Management*, 262, 1443-1451.
- Modig, T., Liden, G., Taherzadeh, J. (2002). Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemical Journal*, 363, 769-776.
- Nattorp, A., Graf, M., Spuhler, C., Renken, A. (1999). Model for Random Hydrolysis and End Degradation of Linear Polysaccharides: Application to the Thermal Treatment of Mannan in Solution. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 38, 2919-2926.
- Needham, J., Ping-Yu, H., Gwei-Djen, L., Sivin, N. (1980). Science and Civilization in China. Vol. 5. Alchemy and Chemistry. Part IV. Apparatus, Theories and Gifts. J. Needham, ed., Science and Civilization in China. Cambridge: Cambridge University Press.
- NOM-070-SCFI-1994. (1994). Norma Oficial Mexicana: Bebidas Alcohólicas-Mezcäl-Especificaciones. Dirección General de Normas. Secretaría de Economía. México.
- NOM-006-SCFI-2005. (2005). Norma Oficial Mexicana: Bebidas Alcohólicas-Tequila-Especificaciones. Dirección General de Normas. Secretaría de Economía. México.
- Nobel. (1998). Los incomparables agaves y cactus. México, 1ª ed., Trillas, p. 166.
- Palmqvist, E., Hahn, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74 (1), 25-33.
- Palmqvist, E., Almeida, S., Hahn, B. (1999). Influence of Furfural on Anaerobic Glycolytic Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in Batch Culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 62 (4), 447-454.

- Pérez, E., González, J. C., Chávez, M. C., Cortés, C. (2013). Fermentative characterization of producers ethanol yeast from *Agave cupreata* juice in mezcal elaboration. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12 (3), 451-461.
- Pinal, L., Cornejo, E., Arellano, M., Herrera, E., Nuñez, L., Arrizon, J., Gschaedler, A. (2009). Effect of *Agave tequilana* age, cultivation field location and yeast strain on tequila fermentation process. *Journal of Industrial Microbiology*, 36 (5), 655-661.
- Plan rector del sistema producto Maguey-Mezcal. (2006). Comité Nacional Sistema Producto Maguey-Mezcal, A.C.
- Querol, A., Jiménez, M., Huerta, T. (1990). A study on microbiological and enological parameters during fermentation musts from poor and normal grape-harvest in the region of Alicante (Spain). *Journal of Food Science*, 55 (6), 1603-1606.
- Ramírez, O., Molina, M. (2005). Evaluación de parámetros cinéticos para *Sacharomyces cerevisiae* utilizando agua de coco como sustrato. *Ingeniería*, 15 (1, 2), 91-102.
- Ribéreau, J., Peynaud, E., Ribéreau, P., Sudraud, P. (1975). *Sciences et Techniques du Vin*. Tome II. Dunod, Paris.
- Ribéreau, P. (1985). New developments in wine microbiology. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36 (1), 1-10.
- Rodríguez, L., Espinosa, G. (1995). Listado florístico del estado de Michoacán, sección I (*Gymnospermae*; *Angiospermae*: *Acanthaceae-Commelinaceae*). *Flora del Bajío y de regiones adyacentes*, 6, 1-208.
- McVaugh, R. (1989) Myrtaceae. In: Howard, R.A. (Ed.) *Dicotyledoneae-Part 2. Flora of the Lesser Antilles, Leeward and Windward Islands*: Arnold Arboretum Harvard University, Cambridge, pp. 463-532
- Santiago, P., López, M., Vera, A. M. (2009). Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de *Agave angustifolia* y *Agave potatorum*. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 32 (4), 273-279.
- Sárvári, I., Franzén, C., Taherzadeh, M., Kiklasson, C., Lidén, G. (2003). Effects of Furfural on the Respiratory Metabolism of *Sacharomyces cerevisiae* in Glucose-Limited Chemostats. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (7), 4076-4086.
- Secretaría de Economía. NOM-006-SCFI-2005. (2006). Norma Oficial Mexicana: Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones. Diario Oficial de la Federación.
- Secretaría de Salud. NOM-142-SSA1-1995. (1996). Norma Oficial Mexicana: Bienes y servicios. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial. Diario Oficial de la Federación.
- Torres, I., Blancas, J., León, A., Casas, A. (2015). TEK, local perceptions of risk, and diversity of management practices of *Agave inaequidens* in Michoacán, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 11(1), 1.
- Valenzuela, A. (1997). El agave tequilero, su cultivo e industria. México: 2ª ed., Monsanto-Líteris, p 204.
- Valle, J.O., Córdova, A., Estarrón, M., Hernández, G., Díaz, D. M. (2009). Effect of the amino-acids supplementation on the *Agave tequilana* juice fermentation by *Kloeckera africana* in batch and continuous cultures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Vallejo, C., González, C. (2000). Identificación de los compuestos volátiles del tequila. *Bebidas Mexicanas*, 8, 1-17.
- Vallejo, B., González, A., Estrada, M. (2004). Tequila volatile characterization and ethyl ester determination by solid phase micro-extraction gas chromatography/mass spectrometry analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (18), 5567-5571.
- Walecx, E., Gschaedler, A., Colonna, B., Monsan, P. (2008). Hydrolysis of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process. *Food Chemistry*, 108 (1), 40-48.
- Walecx, E, Mateos, J., Gschaedler, A. (2011). Use of inulinases to improve fermentable carbohydrate recovery. *Food Chemistry*, 124 (4), 1533-1542.
- Waterhouse, L., Towey, P. (1994). Oak Lactone Isomer Ratio Distinguishes between Wines Fermented in American and French Oak Barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (9), 1971-1974.
- Zambonelli, C. (1988). *Microbiologia e Biotecnologia dei Vini*. Edagricole. Bologna, Italy.
- Zamora, P., Juárez, F., Aguirre, R., Ortiz, P., Godínez, H., Álvarez, F. (2010). Variación de la concentración de azúcares y saponinas durante la cocción del maguey mezcalero Potosino. *Revista Digital Científica y Tecnológica, e-Gnosis*, 8, 1-11.
- Zizumbo-Villareal, D., González, F., Olay, A., Platas, R., Cuevas, M., Almendros, M., Colunga-GarcíaMarín, P. (2009¹). Archaeological Evidence of the Cultural Importance of *Agave* spp. in Pre-Hispanic Colima, Mexico. *Economic Botany*, 63(3), 288-302.
- Zizumbo-Villareal, D., Vargas, O., Rosales, J. J., Colunga-GarcíaMarín, P. (2012). Sustainability of the traditional management of *Agave* genetic resources in the elaboration of mezcal and tequila spirits in western México. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60, 33-47.
- Zizumbo-Villareal, D., González, F., Olay, A., Almendros, L., Flores, P., Colunga-GarcíaMarín, P. (2009²). Distillation in Western Mesoamerica before European Contact. *Economic Botany*, 63(4), 413-426.

Aproximación al estudio de libertad de operación para una línea transgénica de arroz en Colombia

Approach study of freedom to operate for transgenic line rice in Colombia

*Cristina Diazgranados**, *Viviana Hincapié Rojas*** , *Alejandro Chaparro-Giraldo****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.45599

Resumen

El desarrollo de una variedad genéticamente modificada (GM) es un reto científico y legal, tanto por las técnicas de ingeniería genética, como por los derechos de propiedad intelectual (DPI) implicados. Se realizó una aproximación al análisis de libertad de operación para una línea GM derivada de una variedad colombiana de arroz, que exprese una versión optimizada del gen *cry1Ac*, con el propósito de procurar su liberación comercial en Colombia. Para ello, se efectuó una deconstrucción de la innovación, con la cual se determinaron los elementos potencialmente protegibles por DPI, sobre los cuales se efectuaron búsquedas de patentes y solicitudes de patentes en el contexto nacional e internacional, en bases de datos de acceso público. Se encontraron 59 patentes y solicitudes de patentes en el escenario internacional. En la Superintendencia de Industria y Comercio de Colombia (SIC) se encontraron tres solicitudes de patentes que pueden incidir en la libertad de operación para esta innovación. Se concluye que es alta la posibilidad de desarrollar una línea GM de arroz que exprese el gen *cry1Ac* sin afectar interés de terceros, siempre y cuando se cree para comercializarla en el país.

Palabras clave: biotecnología vegetal, *cry1Ac*, derechos de propiedad intelectual, patentes.

Abstract

The development of a genetically modified variety (GM) is a scientific and legal challenge, by genetic engineering techniques used and the intellectual property rights (IPR) involved. Approximate analysis of freedom of operation for a GM line derived from a Colombian rice variety, express an optimized version of the *cry1Ac* gene; in order to pursue their commercial release in Colombia was made. To do this, a deconstruction of innovation, which potentially protectable elements DPI on which patent searches and patent applications were made in the national and international context, databases were determined public access was performed. 59 patents and patent applications were found in the international arena. The Superintendency of Industry and Trade of Colombia (SIC) three applications for patents that may affect the freedom of operation for this innovation were found. It is concluded that the higher the possibility of developing a GM rice line expressing *cry1Ac* gene without affecting the interest of third parties, as long as it is done in the country to commercialize.

Key words: plant biotechnology, *cry1Ac*, intellectual property rights, patents.

Recibido: octubre 16 de 2015

Aprobado: mayo 13 de 2016

Introducción

El cultivo del arroz se desarrolla en 114 países, y es el alimento básico de más de la mitad de la población mundial (FAO, 2004). En Colombia, este cultivo es el

tercer producto agrícola en extensión, representa el 13 % del área cosechada y el 30 % de los cultivos transitorios. Para el 2015 se sembraron por 478. 877 hectáreas, con una producción de 1,34 millones de

* Bióloga, MSc. Grupo de Ingeniería Genética de Plantas. Departamento de Biología & Instituto de Genética. Universidad Nacional de Colombia. E-mail: cristinadiazgranados@hotmail.com

** Licenciada en Biología, MSc. Grupo de Ingeniería Genética de Plantas. Departamento de Biología & Instituto de Genética. Universidad Nacional de Colombia.

*** Ingeniero Agrónomo, MSc., PhD. Grupo de Ingeniería Genética de Plantas. Departamento de Biología & Instituto de Genética. Universidad Nacional de Colombia. E-mail: achaparro@unal.edu.co.

toneladas, y un rendimiento promedio de 4,48 t/ha en el sistema mecanizado y 1,7 t/ha en el sistema manual (FEDEARROZ, 2016).

Las variedades mejoradas se han producido usando técnicas mendelianas convencionales, y han sido exitosas, puesto que más del 90 % del arroz que se siembra en Colombia es producto de las empresas nacionales. Una de las herramientas disponibles para los programas de fitomejoramiento es la ingeniería genética (Diago, 2005; FEDEARROZ, 2008). Pero, el desarrollo de líneas GM puede bloquearse debido a las redes de patentes que afectan las tecnologías básicas de la ingeniería genética (Kowalski *et al.*, 2002), puesto que en diversos países se permite patentar genes o secuencias parciales de DNA, elementos regulatorios, proteínas codificadas por esos genes y sus funciones, vectores usados para la transferencia de genes, organismos genéticamente modificados (GM) (microbios, plantas, animales) y sus líneas celulares, y procesos para desarrollar organismos GM (Lakshimikuraman & Phillips, 2005).

Existen reportes de efectos negativos de las redes de patentes sobre el desarrollo de líneas GM de cultivos agrícolas. La liberación comercial del arroz dorado se dificultó por las 40 patentes implicadas en su desarrollo (Kowalski *et al.*, 2002). La Comisión Nacional de Fresa de los Estados Unidos interrumpió el desarrollo de una variedad de fresa GM resistente a una enfermedad fungosa, debido al cúmulo de patentes que protegían tecnologías necesarias para su desarrollo (Thomas, 2006). La Universidad de Michigan fue obligada a destruir una línea GM de pastos de forraje, debido a la demanda no resuelta entre las compañías detentoras de la patente del gen y de la región promotora (Thomas, 2006).

Sin embargo, las patentes son limitadas a una jurisdicción nacional y a un tiempo determinado, pueden aceptar excepciones o cubrir objetos diferentes de acuerdo con la regulación local, o pueden no estar vigentes (BIOS, 2009). Es necesario efectuar estudios de libertad de operación, que establezcan la propiedad intelectual involucrada en una línea GM de un cultivo de interés. Se precisa deconstruir el producto, para listar los materiales biológicos y los protocolos que se usaron en su desarrollo, para luego hacer el análisis de los derechos de propiedad intelectual relacionados con cada elemento (Kryder *et al.*, 2000).

Las estrategias para maximizar la libertad de operación en líneas GM de cultivos agrícolas pueden ser: rediseñar las construcciones genéticas, cuando estas son la base de la innovación; establecer licencias libres de regalías, cuando se trate de fines humanitarios; tramitar licencias de manera individual o a través de consorcios; o una combinación de todas las anteriores (Kryder *et al.*, 2000).

Se desarrolló una aproximación al estudio de libertad de operación, para una línea GM derivada de la variedad Fedearroz 2000, que exprese un gen semisintético *cry1Ac*. La hipótesis es que existe la posibilidad de usar tecnología patentada para el desarrollo y comercialización de una línea transgénica de arroz, en el escenario nacional. Este trabajo hace parte del convenio Federación Nacional de Arroceros de Colombia (FEDEARROZ) - Universidad Nacional de Colombia (UNC), del que es responsable el Grupo de Ingeniería Genética de Plantas de la Universidad Nacional de Colombia (IGP-UN).

Materiales y métodos

El diseño y construcción *in silico* del casete de expresión se realizó mediante el uso de herramientas de bioinformática de acceso libre. El constructo fue formado por una región promotora de la ubiquitina de maíz, la versión optimizada del gen *cry1Ac*, y la región promotora NOS de *Agrobacterium tumefaciens* (Diazgranados *et al.*, 2013). Se contrató el servicio de síntesis y transferencia al vector pCAMBIA 2300, con una empresa norteamericana. No se dispone, actualmente, de material transgénico para experimentación en condiciones controladas o en condiciones de campo.

Deconstrucción del producto. Consistió en determinar todos los materiales biológicos y protocolos que se pueden usar en el desarrollo de la línea GM derivada de Fedearroz 2000 y que exprese el gen *cry1Ac* optimizado. Luego, se determinó el estado de la propiedad intelectual para cada uno de los elementos listados (Kryder *et al.*, 2000).

Revisión de documentación. Para el análisis de la información relacionada con el desarrollo de la línea GM de arroz, se trabajó con dos tipos de documentos: documentos base y documentos suplementarios (Hincapié, 2012).

Los documentos base son: a) cuadernos de laboratorio; b) artículos publicados; c) tesis de grado; d) acuerdos de transferencia de material; e) acuerdos de confidencialidad; f) convenios de cooperación y financiación; g) contratos; h) normatividad Universidad Nacional de Colombia; i) normatividad colombiana (Hincapié & Chaparro-Giraldo, 2013).

Los documentos suplementarios son: patentes y solicitudes de patentes que están involucradas en el desarrollo del producto. Se buscaron en tres bases de datos de patentes internacionales y una base de datos de patentes nacionales, todas las bases de datos consultados son públicas: 1) Patent Lens: (<http://www.lens.org/lens/>); 2) Espacenet: Oficina Europea de Patentes (<http://www.epo.org/index.html>); 3) Oficina de patentes japonesa (<http://www.jpo.go.jp/index.htm>); 4) Superintendencia de Industria y Comercio (http://serviciospub.sic.gov.co/~oparra/serv_57/externas/datospatente.php) SIC (Hincapié & Chaparro-Giraldo,

2013). Estas búsquedas se terminaron en enero de 2013.

Planteamiento de estrategia para maximizar la libertad de operación. A partir del análisis de los resultados obtenidos, se buscó establecer una estrategia para obtener un máximo de libertad de operación, que permita la comercialización de la innovación biotecnológica, sin afectar los derechos de terceros.

Resultados y discusiones

Deconstrucción del producto. El primer paso para realizar un estudio de operación es realizar la deconstrucción del producto, para ello se emplearon los cuadernos de laboratorio, y una tesis de maestría (Perafan, 2011). A partir de esa información se elaboró la tabla 1. Se encontraron 8 elementos involucrados en el producto y 27 descripciones.

Tabla 1. Elementos resultantes de la deconstrucción de la línea GM de arroz.

Elemento	Descripción
Plantas/ semillas	Gramínea
	Monocotiledóneas
	<i>Oryza sativa</i>
	Subespecie indica
	Variedad Fedearroz 2000
Sistema de callogénesis	Cultivo de tejidos
	Semilla madura
	Callos derivados del escutelo
	Callos embriogénicos
Sistema de transformación	Sistema Agrobacterium
	Vector de transformación
	Cepa LBA4404
	Cocultivo líquido
	Cocultivo sólido
Sistema de regeneración	Cultivo de tejidos
	Regeneración a partir de callo
Plásmidos	pCambia 2300
Casete de expresión	Promotor de la Ubiquitina
	Gen cry-igp
	Terminados NOS
Casete de selección	Promotor 35S
	Gen nptII
	Terminador NOS
Gen cry-igp	Gen semisintético
	Proteína insecticida
	Proteínas cry
	Gen y proteína cry1Ac

Una vez realizada la deconstrucción del producto, cada una de las descripciones que hacen parte de los

elementos, son utilizadas para determinar qué tipo de documento puede estar relacionado con ellas.

Revisión de documentación. Para determinar el tipo de documento que está relacionado con cada elemento y así direccionar su búsqueda, se tomó cada elemento que conforma el producto y se estableció el tipo de documento relacionado, cuyos resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Documentación relacionada con cada uno de los elementos de la deconstrucción del producto

Elemento	Documento
Plantas/ semillas	Normatividad Colombiana
	Convenios
Sistema de callogénesis	Cuadernos de laboratorio
	Tesis de grado
	Patentes
Sistema de transformación	Cuadernos de laboratorio
	Tesis de grado
	Patentes
	ATMs
Sistema de regeneración	Cuadernos de laboratorio
	Tesis de grado
	Patentes
Plásmidos	Patentes
	Acuerdos de transferencia de materiales
Casete de expresión	Cuadernos de laboratorio
	Tesis de grado
	Patentes
	Acuerdos de confidencialidad
Casete de selección	Cuadernos de laboratorio
	Tesis de grado
	Patentes
Gen CRY-IGP	Cuadernos de laboratorio
	Tesis de grado
	Patentes
	Acuerdos de confidencialidad
	Convenios
	Contratos
	Normatividad UN
	Normatividad Colombiana

Se realizó la búsqueda de los documentos relacionados con cada elemento, y se determinó su estado actual. Para organizar y analizar la cantidad de documentación relacionada se dividen en documentos base y documentos suplementarios para ser analizados.

Tabla 3. Documentos primarios relacionados con los elementos de la deconstrucción del producto

Documento	Nombre	Existe	No Existe	Observaciones
Normatividad Colombiana	Certificado de obtentor de la variedad FDEARROZ 2000.	✓	✓	Registro N° A00498 del 13 de abril de 2004
	Registro ante el ICA como Unidad de Fitomejoramiento para trabajar con arroz GM de IGP-UN.	✓	✓	Resolución no, 3523 del 14 de octubre de 2008 por la cual se ordena el registro como unidad de investigación en fitomejoramiento al IGP de la UNC.
Normatividad UN	Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional de Colombia	✓	✓	Por el cual se expide el reglamento sobre propiedad intelectual de la Universidad Nacional de Colombia.
Tesis de Maestría	Sistema de regeneración para arroz (<i>Oryza sativa</i> spp indica). Autor: Ricardo Perafan	✓	✓	Copia física y virtual.
Cuadernos de laboratorio	Cuadernos de laboratorio del Grupo de Ingeniería Genética de Plantas (IGP)	✓	✓	Mantenidos en la oficina del grupo.
Acuerdos de confidencialidad	Integrantes Grupo de Ingeniería Genética de Plantas (IGP)	✓	✓	Acuerdo de compromiso firmado por los estudiantes de pregrado y postgrado.
Acuerdos de Transferencia de Materiales (ATMs)	ATM de cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con la Universidad de Kobe-Japón.	✓	✓	Acuerdo de palabra entre investigadores
	ATM de los plásmidos pCambia con CAMBIA	✓	✓	En estos acuerdos se autoriza el uso para investigación.
Convenios	Convenio Específico de Cooperación Técnica y Científica entre la Federación Nacional de Arroceros – FEDEARROZ – y la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá.	✓	✓	Cláusula 18 “los resultados serán compartidos entre las instituciones, en los términos establecidos en las normas generales vigentes sobre derechos de autor y en las reglamentaciones internas de la universidad”.
Contratos	Contrato de compra con la empresa GenScript USA INC par la síntesis del gen cry-igp.	✓	✓	N° de orden de compra 76836

Inicialmente se comenzó a revisar y analizar todos los documentos base relacionados con el producto. En la tabla 3 se presenta la lista de estos documentos.

La resolución número 3523 del 14 de octubre de 2008 del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) ordena el registro del grupo de Ingeniería Genética de Plantas de la Universidad Nacional de Colombia (IGP-UN) como Unidad de Investigación en Fitomejoramiento, de materiales convencionales y genéticamente modificados de papa y arroz. Es obligatoria la solicitud de permiso para trabajos en OGMs con fines agrícola, ante la Comisión Técnica Nacional de Bioseguridad, según el decreto 4525 de 2005. En el estado actual de la investigación no se ha generado material GM.

Con relación a la normatividad interna, el acuerdo 035 del 2003 del Consejo Académico establece el reglamento sobre propiedad intelectual de la Universidad Nacional de Colombia. En el artículo 26 se indica que son propiedad de la universidad las invenciones patentables, y otras creaciones, resultantes de los actividades de sus profesores, estudiantes, monitores, empleados administrativos y contratistas, cuando: a) sean parte de los compromisos laborales, contractuales o académicos con la institución; b) sean producto

de investigaciones contratados por terceros de acuerdo con los términos de contrato; y c) se utilicen las instalaciones y/o los recursos o medios de que dispone la universidad. El parágrafo del artículo señala que, en todo caso, tendrán derecho de ser mencionados como inventores. El artículo 27 sobre la titularidad en investigación cofinanciada, establece que será propiedad de la universidad y de la entidad cooperante o financiadora. El artículo 31 instituye que las regalías que correspondan a la universidad, se repartirán así: 35 % para la facultad o instituto interfacultades donde se generó la invención, 30 % para el autor y sus colaboradores, 20 % para el fondo de la Dirección Académica de la respectiva sede, 15 % para programas prioritarios o emergentes. El artículo 32 insta que, si la universidad no licencia o comercializa en el término de dos años, podrá otorgar licencia de explotación comercial al inventor, siempre y cuando este lo solicite.

Los acuerdos de confidencialidad son firmados por el estudiante y el director del IGP-UN, y se denomina “Acuerdo de Compromiso”. En el numeral 5, el estudiante se compromete a no utilizar ninguna parte de la información generada en la realización de su proyecto, en cualquier tipo de publicación o comunicación, sin permiso escrito del director. En el numeral 6, el

estudiante se compromete a proporcionar al director del grupo, copias de todos los diseños experimentales, análisis estadísticos, resultados de experimentos, bosquejos o cualquier tipo de información generada durante la realización del proyecto de investigación, y declara que toda esta documentación es de propiedad del IGP-UN. En el numeral 7, se afirma que los derechos de propiedad intelectual sobre los resultados del proyecto en el que participa son de la UNC y de las instituciones financiadoras, si así lo establecen los respectivos contratos de investigación.

En relación con el convenio firmado con FEDEARROZ, debe aclararse si la cláusula 18 sobre propiedad intelectual, en la que se afirma que los resultados serán compartidos, cubre solo los derechos de autor, o si se considera que también cubre los derechos de propiedad industrial.

Finalmente, el análisis de los ATMs y el contrato del servicio de síntesis, muestran asuntos que se deben resolver: a) falta el acuerdo de transferencia con la Universidad de Kobe (Japón) sobre cepas de *Agrobacterium tumefaciens* firmado por ambas partes; b) CAMBIA autoriza el uso de los plásmidos sólo para investigación; c) en el contrato para la síntesis del gen existe una nota en inglés “all reagents research use only”, que se podría interpretar como una limitación al uso del casete de expresión sólo para investigación.

Derechos de propiedad intelectual

La búsqueda de patentes y solicitudes de patentes se inició por la base de datos Patent Lens. La pesquisa se efectuó introduciendo varias combinaciones de palabras relacionadas con los elementos resultados de la deconstrucción, en total se emplearon 57 combinaciones. La búsqueda por combinación se hizo inicialmente en el texto completo y luego en el campo de las reivindicaciones (“claims”). Se inspeccionó el título y se seleccionaron las relacionadas con los elementos, luego a cada una se revisó las reivindicaciones para determinar cuáles podrían tener una relación directa con el producto. En esta base de datos se encontraron 39 documentos que podrían estar relacionadas directamente con el producto: 26 de los Estados Unidos, 11 europeas y 2 son australianas. Los mayores solicitantes o propietarios de patentes son Monsanto (10), seguido por Japan Tobacco (6) y Pioneer Hi Bre International (6). Aparecen universidades norteamericanas como “University of California” y “Purdue University”.

A continuación se hizo otra búsqueda en la base de patentes Europeas (Espacenet). Para la indagación se siguió el mismo procedimiento anteriormente descrito. Se encontraron 11 documentos, diferentes a los encontrados en Patent Lens, que posiblemente estarían relacionadas directamente con el producto.

Finalmente se realizó la búsqueda en la base de datos del Japón, usando la aproximación descrita atrás.

Se encontraron 9 documentos, posiblemente relacionadas con el producto, diferentes a las encontradas en las bases de datos previamente consultadas. Estas patentes son de propiedad de instituciones japonesas.

Los resultados generales de las búsquedas en las bases de datos internacionales, se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Número de patentes y solicitudes de patentes relacionadas con el desarrollo de una línea GM de arroz que exprese la proteína cry1Ac encontradas en bases de datos internacionales hasta enero de 2013.

Base de datos	Número de patentes
PatentLens	39
Espacenet	11
JOP	9
Total	59

Se unificaron todos los documentos hallados en las tres bases de datos, eliminando los repetidos, encontrando que 59 patentes y solicitudes de patentes pueden estar involucradas directamente con el producto. Estas patentes han sido solicitadas en el extranjero y, por lo tanto, sólo sí se han concedido en el territorio nacional, pueden afectar realmente al producto, si este se planea liberar únicamente en Colombia.

Por último, se revisó la base de datos nacional de la SIC. Las opciones de búsqueda no son tan ágiles, ni permiten combinaciones como en las bases de datos internacionales. Se necesita el número del expediente, de la gaceta o de certificado, o los datos de creación. Estos datos son útiles si se quiere acceder a una patente determinada, pero no si se trata de buscar patentes sobre genes, por ejemplo. Después de intentar varias estrategias de búsqueda, usando palabras en el título o en el resumen, sin ningún resultado, la mejor opción fue por nombre de la persona natural o jurídica, usando los nombres de las empresas encontradas en la búsqueda internacional. Luego se combina con el cultivo de interés, y el elemento en particular (plantas, semillas, sistemas de transformación o de regeneración, plásmidos, casetes de expresión, genes, proteínas). Así, se encontraron treinta patentes y solicitudes que podrían estar relacionadas, pero analizándolas con detenimiento, se encontró un grupo de 11 expedientes directamente relacionadas con el producto. En la tabla 5, se presentan los resultados.

La información contenida en la tabla 5, muestra que los actores globales en el patentamiento de tecnologías básicas de ingeniería genética de plantas, también están interesados en Colombia. Las corporaciones multinacionales Monsanto, Bayer CropScience, Dupont y Syngenta aparecen en esta muestra. También están presentes, nombres de empresas que han sido

Tabla 5. Lista de expedientes sobre patentes y solicitudes de patentes relacionados con una línea GM de arroz que exprese la proteína cry1Ac, encontradas en la base de datos nacional de la Superintendencia de Industria y Comercio (SIC) de Colombia, en mayo de 2012.

Titulo	Expediente	Fecha solicitud	Solicitante	Estado	Fecha del estado
Genes de toxinas y métodos para su uso	10 157545	15/12/2010	Athenix Corporation	Requerimiento 45	16/01/2013
Secuencias de nucleótidos que codifican proteínas insecticidas.	8 19688	26/02/2008	Monsanto Technology, LLC	Requerimiento 45	17/01/2013
Composiciones insecticidas y métodos para crear plantas transgénicas resistentes a insectos	8 19691	26/02/2008	Monsanto Technology, LLC	Abandono	23/03/2010
Métodos y composiciones para el control genético de infestaciones de insectos en plantas.	8 27244	14/03/2008	Monsanto Technology, LLC	Requerimiento 45	17/01/2013
Composiciones insecticidas y métodos para el control de infestaciones de insectos en plantas	6 101066	06/10/2006	Monsanto Technology, LLC	Negación	24/08/2012
Proteínas insecticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i> y usos de la misma	6 1259	06/01/2006	Monsanto Technology, LLC	Negación	23/12/2010
Nuevos polipéptidos cristalinos y polinucleótidos de <i>Bacillus thuringiensis</i> y composiciones con los mismos.	6 84256	25/08/2006	Pioneer hi-bred international inc	Negación	17/04/2012
Composición de cry 1c modificada para la expresión de d-endotoxinas activas contra lepidópteros en plantas.	97-69522	01/11/1997	Ecogen	Caducado	23/03/2007
Método para la selección de plantas transformadas	98 21626	20/04/1998	Syngenta mogen	Caducado	26/12/2007
Composiciones que contienen proteínas pesticidas, cepas de <i>Bacillus</i> , proteínas y genes que codifican a las proteínas de <i>Bacillus</i>	95 42464	15/09/1995	Novartis AG	Caducado	16/04/2010
Método de transformación y plantas transgénicas producidas por este		18/07/2000	John innes centre	Abandono	19/02/2003

adquiridas por estas entidades, como Athenix Corporation que fue adquirida por Bayer CropScience en noviembre de 2009 por 365 millones de dólares (Bayer CropScience, 2009), y Pioneer Hi-Bred que fue adquirida por una alianza Dupont – Syngenta en 1999 por 7.7 mil millones de dólares (ETC, 2011). También emergen otras entidades como “Jhon Innes Center” que es un centro independiente e internacional de excelencia basado en Inglaterra (<http://www.jic.ac.uk>), y la empresa Ecogen, de origen español (<http://www.ecogen.com/>).

Estos 11 expedientes sobre patentes y solicitudes de patentes, relacionados con la línea GM de arroz que exprese la proteína cry1Ac, encontrados en la base de datos de la SIC, han corrido con diferente suerte. Dos han sido abandonados, uno por Monsanto y otro por Jhon Innes Center. Tres han caducado, patentes de Novartis, Syngenta y Ecogen. Dos le fueron negados

a Monsanto, y otro negado a la empresa Pioneer Hi-Bred. Tres se encuentran en proceso de requerimiento, dos de Monsanto y uno para Bayer CropScience a través de Athenix Corporation.

Cuando las solicitudes de patentes están en requerimientos, se debe a la falta de información que demuestre la novedad y/o el nivel inventivo de la patente, por lo cual el solicitante debe presentar información adicional que soporte su petición. En el estudio de fondo de la solicitud se requiere de mayor información del solicitante cuando no cumple con alguno de los requisitos establecidos para la concesión de la patente, para ello cuenta con el “plazo de sesenta días contados a partir de la fecha de la notificación. Este plazo podrá ser prorrogado por una sola vez por un período de treinta días adicionales” (artículo 45 de la Decisión 486 de 2000 de la CAN).

Es necesario analizar las reivindicaciones de las solicitudes de patentes y patentes consideradas, como criterio de decisión de si tienen o no efecto sobre la libertad de operación de la innovación biotecnológica. Por ejemplo:

a) La solicitud 8 19691, titulada “Composiciones insecticidas y métodos para crear plantas transgénicas resistentes a insectos”, con fecha de publicación 31 de agosto de 2009 y Monsanto como solicitante. Las reivindicaciones 5 y 7 se refieren respectivamente a “una plaga de plantas de Coleópteros o de Hemípteros, y cuando una plaga de Coleópteros es un gusano de la raíz de maíz y dicha plaga de Hemípteros es un chinche del género *Lygus*”. La especificidad de estas reivindicaciones, no cubre el caso de insectos lepidópteros en el cultivo de arroz (SIC, 2013a).

b) La solicitud 8 19688, titulada “Secuencias de nucleótidos que codifican proteínas insecticidas”, con fecha de publicación 31 de agosto de 2009 y Monsanto como solicitante. La reivindicación 4 incluye plantas de cultivo monocotiledóneas y dicotiledóneas. En la reivindicación 5, en la lista de plantas monocotiledóneas aparece el arroz. Si se concede este patente, puede tener efecto sobre la comercialización de la innovación objeto de este estudio. (SIC, 2013b).

Planteamiento de estrategia para maximizar la libertad de operación

De acuerdo con los resultados arrojados por la búsqueda se podría concluir que a nivel internacional la comercialización de una planta de arroz transgénico estaría cercada por una red de patentes, lo que haría casi imposible que esta saliera al mercado internacional. Aunque es necesario determinar en qué países interesaría comercializar el producto, para así establecer la situación real de derechos de propiedad intelectual con respecto a este producto en ese país.

Según lo revisado en Colombia el panorama es bien diferente. Existen tres solicitudes de patente en trámite que pueden estar involucradas directamente con el producto. De las tres solicitudes de patentes analizadas, parece claro que una de ellas no tiene incidencia sobre la innovación. En Colombia el arroz es un cultivo en el que toda la producción es para consumo interno, lo que facilita el análisis del contexto de la libertad de operación del producto, puesto que el escenario local es el relevante.

Pero existen dos asuntos que pueden restringir la libertad de operación, y que no están relacionados con patentes. El primero es la cláusula que limita el uso solo para investigación del casete de expresión, presente en el contrato de servicio con la empresa norteamericana. Ello se puede resolver, contratando otro servicio de síntesis de genes, con una empresa que elimine esa restricción en el contrato. El segundo es el resultado de la solicitud de patente 8 19688, que, si es aproba-

da, incluiría al arroz dentro de los cultivos protegidos. Hay que hacerle el seguimiento al proceso, en el que pueden cambiar las reivindicaciones que finalmente ser acepten, y actuar en consecuencia.

Inicialmente y con miras a la liberación del producto se debe hacer una revisión más exhaustiva de estas patentes con la asesoría de un abogado especialista en el tema para determinar que tantas de estas patentes pueden estar influyendo sobre el producto. Este análisis debe actualizarse tanto en el momento de la obtención de la línea transgénica, como en el de la comercialización de la innovación. Teniendo claro esto, se podrían desarrollar modificaciones en el proceso del producto para aumentar los grados de libertad de operación. Finalmente, y si es necesario, se podría entrar a negociar un licenciamiento de las patentes que impacten el producto.

Conclusiones

En el mundo se patentan tecnologías básicas para el desarrollo de líneas GM de cultivos agrícolas, que constituyen unas redes que limitan o impiden su uso comercial. Es importante desde el inicio de los proyectos tener claro el escenario de los derechos de propiedad intelectual que pueden afectar la libertad de operación de tales productos. Para realizar los estudios de libertad de operación se necesita hacer una deconstrucción de la innovación estableciendo los materiales, componentes y técnicas de laboratorio que se usarán para su desarrollo. Esta información está disponible en documentos como cuadernos de laboratorio, tesis de grado y postgrado, y artículos científicos. Una vez conocidos los elementos que componen la innovación, se procede a la búsqueda y análisis de patentes y otros derechos de propiedad intelectual, primero en el plano global, y luego en el plano nacional. En este trabajo es esencial tener en cuenta otros documentos como acuerdos de transferencia de material, convenios, y contratos de trabajo, así como las reglamentaciones internacionales, nacionales e interinstitucionales sobre propiedad intelectual.

En el contexto de la innovación estudiada, se han cuidado varios flancos que pueden causar problemas. En el convenio con FEDEARROZ existe una cláusula mínima sobre propiedad intelectual, existen acuerdos de confidencialidad, y la universidad tiene un reglamento interno sobre propiedad intelectual. Sin embargo, la cláusula que limita el uso del casete de expresión para investigación, en el contrato del servicio de síntesis, puede tener un efecto negativo, así como la aprobación de la solicitud de patente 8 19688.

A nivel internacional es muy difícil liberar comercialmente una línea GM de arroz que exprese el gen *cry1Ac*, debido a las 59 patentes que la afectan. Cuando se analiza en el contexto colombiano, la situación puede variar, puesto que las patentes no son globales, expiran, pueden ser derogadas y cubren diferentes ob-

jetos. En el presente análisis se encontraron tres solicitudes de patentes en estudio de fondo por parte de la SIC. Otras solicitudes de patentes relacionadas con el producto fueron abandonadas, negadas o caducaron. Entonces es posible el desarrollo y comercialización de una línea GM de arroz derivada de la variedad Fedearroz 2000 que exprese el gen *Cry1Ac*, siempre y cuando se haga en el contexto local colombiano y se resuelvan los problemas detectados.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el marco del convenio específico de cooperación técnica y científica celebrado entre la Federación Nacional de Arrozeros (FEDEARROZ) y la Universidad Nacional de Colombia, para la ejecución del proyecto “Desarrollo de sistemas de ingeniería genética para cultivares colombianos de arroz”. Los autores agradecen a las dos instituciones por el apoyo recibido.

Referencias bibliográficas

- Bayer CropScience. (2009). Bayer CropScience completes acquisition of biotech company Athenix Corp. Bayer science for a better life. Disponible en: http://www.bayer.nl/ebbsc/cms/nl/nieuws/nieuwsberichten/BCS_Athenix.html. [Fecha de consulta: 1 de marzo de 2014]
- BIOS. (2009). What does “Freedom to Operate” mean?. Disponible en: <http://www.patentlens.net/daisy/patentlens/2768.html>. [Fecha de consulta: 1 de febrero de 2014]
- Diazgranados, C, Sandoval, AM, Chaparro-Giraldo, A. (2013). Diseño de un gen semisintético *cry1Ac* análisis de la estructura de la proteína traducida. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 11(1s), 134-143.
- Diago, M. (2005). Compendio de Resultados de Investigación 2003-2005. Bogotá: Fedearroz - Fondo Nacional del Arroz, p. 150.
- ETC. (2011). ¿Quién controlará la economía verde?. Comunique 107. ETC group. Disponible en: http://www.etcgroup.org/es/content/%C2%BFqui%C3%A9n-controlar%C3%A1-la-econom%C3%ADa-verde_. [Fecha de consulta: 15 febrero de 2014]
- FAO. (2004). 28ª Conferencia Regional de la FAO Para América Latina y el Caribe. Año Internacional del Arroz. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/meeting/007/j1225s/j1225s00.htm> [Fecha de consulta: enero de 2014]
- FEDEARROZ. (2016). Estadísticas arroceras. Área, producción y rendimiento. Disponible en http://www.fedearroz.com.co/new/apr_public.php [Fecha de consulta: 10 de mayo de 2016]
- Hincapié, V. (2012). Estudio de libertad de operación de la línea transgénica de papa *cry1Ac* desarrollada por la Corporación para Investigaciones Biológicas y la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá. Facultad de Derecho, Ciencias Políticas y Sociales. Maestría en Biociencias y Derecho, p. 195.
- Hincapié, V, Chaparro-Giraldo, A. (2013). Metodología para analizar la libertad de operación en cultivos genéticamente modificados (GM). En: Propiedad intelectual y regulación en biotecnología vegetal: el caso de los cultivos genéticamente modificados (GM). (Compilador A. Chaparro-Giraldo). Bogotá: editorial Universidad Nacional de Colombia. p. 139.
- Kowalski, S, Eborá, B, Kryder, D, Potter, R. (2002). Transgenic crops, biotechnology and ownership rights: what scientists need to know?. *The Plant Journal*, 31(4), 407-421.
- Kryder, R, Kowalski, S, Krattiger, A. (2000). The Intellectual and Technical Property Components of pro-Vitamin A Rice (GoldenRice-TM): A Preliminary Freedom-To-Operate Review. ISAAA Briefs No. 20. ISAAA: Ithaca, NY. p 56
- Lakshimikuraman, M. & Phillips, P. (2005). Patenting of biotechnological innovations. *Asian Biotechnology and development review*, 7 (2), 25-44.
- Perafan, R. (2011). Determinación de un sistema de regeneración para variedades colombianas de arroz (*Oriza sativa* spp indica). Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia – Bogotá. Facultad de Agronomía. Maestría en Ciencias Agrarias, p. 88.
- SIC. (2013a). Resumen de la patente “Métodos y composiciones para el control genético de infestaciones de insectos en plantas”. 2013. Disponible en: http://docsrodas.sic.gov.co/Patentes/patente.php?id_patente=68170_. [Fecha de consulta: 12 enero de 2014]
- SIC. (2013b). Resumen de la patente “Secuencias de nucleótidos que codifican proteínas insecticidas”. 2013. Disponible en: http://docsrodas.sic.gov.co/Patentes/patente.php?id_patente=68243_. [Fecha de consulta: 12 enero de 2014].
- Thomas, Z. (2006). Agricultural Biotechnology and proprietary rights, challenges and policy options. *The Journal of world intellectual property*, 8, 711-734.

Evaluación inicial de parámetros de campo en un biodigestor anaeróbico para el tratamiento de aguas residuales

Preliminary evaluation of field parameters at an anaerobic biodigester designed for the treatment of wastewater

María Antonieta Sánchez Góngora^{*}, *Ignacio Enrique Peón Escalante*^{**},
Teresita Cardona Juárez^{**}, *Lesli Ortega Arroyo*^{**}, *Guillermo Urriolagoitia Calderón*^{***}

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57725

Resumen

El biodigestor anaerobio utilizado en este estudio, se diseñó para tratar agua residual doméstica en un sanitario de prueba, y se caracteriza por ser de: flujo continuo, baja carga orgánica y tener cuatro etapas de proceso.

La importancia del prototipo estudiado radicó en las condiciones reales en que se probó. La primera etapa consistió en la selección del sitio, construcción del prototipo en ferrocemento con capacidad de 1m³, impermeabilización y carga. En esta etapa se inoculó el reactor con materia orgánica procedente de las descargas del sanitario, durante el periodo de agosto a diciembre de 2011.

La evaluación de este periodo consistió en la medición de parámetros de campo: pH, conductividad eléctrica, sólidos sedimentables, temperatura del influente - efluente y oxígeno disuelto del sistema que permitieron verificar el comportamiento del proceso del digestor durante la fase de arranque.

Los resultados obtenidos para estas determinaciones a la entrada y salida del biodigestor respectivamente son los siguientes: pH (8.03; 8.43), conductividad eléctrica (1510.83 µS/cm; 1207.00 µS/cm), temperatura del proceso (19.2°C; 20.1°C), sólidos sedimentables (144.5mL/L; 0.02mL/L), oxígeno disuelto (4.5992 mg/L; 0.1924 mg/L) estos datos proporcionaron un punto de partida para el tratamiento de aguas residuales de tipo doméstica.

Palabras clave: agua residual, agua tratada, biodigestión, biodigestores de flujo continuo, digestor, temperatura psicrófila.

Abstract

The anaerobic biodigester analyzed in the present study was designed for the treatment of domestic wastewater in a test restroom, characterized by its continuous flow, low organic load and a four-stage processing system.

The value of the prototype under research consists in the real daily conditions under which it was tested. The first stage consisted of the site selection, and the manufacture of a waterproof iron reinforced cement prototype, with a 1m³ loading capacity. At this stage, during the period from august to december 2011, the reactor was inoculated with organic matter originating from the aforementioned restroom discharges.

The evaluation of this stage consisted in taking measurements of the following field parameters: pH, electrical conductivity, sedimentable solids, and inflow and outflow temperature along the system. These records substantiated the behaviour of the processes within the digester during the starting phase.

The results obtained through these determinations at both the biodigester entry and exit points are respectively: pH (8.03; 8.43), electrical conductivity (1510.83 µS/cm; 1207.00 µS/cm), inflow and outflow temperatures (19.2°C; 20.1°C), sedimentable solids (144.5mL/L; 0.02mL/L) and dissolved oxygen (4.5992 mg/L; 0.1924 g/L). These data provided a starting point for the treatment of domestic wastewater.

Key words: wastewater, treated water, biodigestion, continuous flow biodigesters, digester, psychrophilic temperature.

Recibido: diciembre 10 de 2015 **Aprobado:** mayo 20 de 2016

* PhD. Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica del Instituto Politécnico Nacional (ESIME-IPN) Zacatenco IPN Edif. 5, 3° Piso Av. Luis Enrique Erro s/n Zacatenco, Gustavo A. Madero 07738, México, Distrito Federal. mariaantonieta_gongora@yahoo.com.mx (México)

** PhD. (ESIME-IPN) Zacatenco. ignaciopeon@gmail.com (México)

** M. at C. (CIITEC-IPN) Azcapotzalco. sanfer_73@yahoo.com.mx (México)

** PhD. (ESIME-IPN) Azcapotzalco. lortegaa@ipn.mx (México)

*** PhD. (ESIME-IPN) Zacatenco. urrio332@hotmail.com (México)

Introducción

La generación de agua residual es alta a nivel mundial, de la cual se estima que entre el 90 y el 95 % del agua residual municipal descargada no recibe tratamiento depurativo alguno, esto afecta la calidad de los cuerpos de agua superficiales por la presencia de agentes contaminantes como: materia orgánica soluble y suspendida, nitrógeno, amonio, fosfatos, sulfatos los cuales derivan de la materia orgánica en descomposición o de compuestos químicos de origen antropogénico; dichos nutrientes al encontrarse en altas concentraciones activan la eutrofización de los cuerpos (Cervantes *et al.*, 2011).

Además de contaminar los suelos con metales pesados (Keser *et al.*, 2012), el agua negra es considerada un riesgo para la salud (Panikkar *et al.*, 2010) por ser portadora de bacterias, virus, coliformes, protozoarios, amebas, huevo de helminto y nematodos. (Cervantes *et al.*, 2011; Keser *et al.*, 2012)

Sin embargo, al paso del tiempo y la escasez de agua ha llevado a usar el agua residual para riego agrícola, valorando en el influente una alternativa sostenible en la agricultura convencional (Cortois *et al.*, 2012). En México una gran cantidad de este líquido se reusa en labores agrarias, y un menor porcentaje en industrias y en termoeléctricas.

El caso del Valle de México, tiene importancia al estar constituido por 100 municipios ubicados en Estado de México, Hidalgo, Tlaxcala además de las 16 delegaciones de la Ciudad de México; alcanzando un abastecimiento de agua potable del 96.5 %, disponer de una red de alcantarillado con cobertura del 97.2 % y tratar únicamente el 10 % del agua servida eliminada.

Este porcentaje es bajo, considerando que se eliminan 1255.8 millones de m³/año de agua residual y la infraestructura existente para su tratamiento solo puede manejar 8655 L/seg, de los cuales se procesan únicamente 4353 L/seg de agua servida (De la Peña *et al.*, 2013).

El agua residual puede tratarse mediante procesos biológicos aerobios o anaerobios, donde cada tratamiento tiene requerimientos particulares de oxígeno disuelto, ambos procesos se fundamentan en los ciclos de la naturaleza, donde los microorganismos consumen la materia orgánica para producir material celular nuevo o gas, utilizando dichos procesos para estabilizar la materia orgánica, coagular y remover los sólidos coloidales que no pueden sedimentarse así como, para reducir nutrientes (nitrógeno y fósforo) (Torres *et al.*, 2012).

Además, los tratamientos anaerobios se destacan por ser una opción de bajo costo (Cervantes *et al.*, 2011), sostenibles, fácil implementación, menor producción de lodos y ser útiles para procesar agua residual doméstica e industrial. (Lettinga *et al.*, 1995).

Estos procesos se desarrollan en diversos tipos de biodigestores, como el reactor (UASB) tipo Upflow con lecho anaeróbico de lodos, el digestor (EGSB) en cuya cama granular extendida se usan completamente sus lodos y tienen una mayor cantidad de microorganismos participantes en el proceso.

Los grupos tróficos microbianos que se encuentran en los lodos, estructuran redes con organismos fermentativos y organismos metanogénicos que degradan completamente los residuos lo que contribuye a una operación estable y eficiente del reactor (Oz *et al.*, 2012), en condiciones ambientales donde la biomasa se puede climatizar, adaptar e inmovilizar facilitando la formación de micro-nichos que al tener contacto suficiente con el agua residual (Lettinga *et al.*, 1995), y los valores característicos en sus parámetros químicos como el pH, la temperatura y el oxígeno permiten la competencia de unos microorganismos con otros de diferente metabolismo (Grady *et al.*, 2000).

La estabilidad de las citadas variables depende de: caracterizar el influente, tipo de lodo, tasa de carga orgánica; para lo cual se requiere de un diseño y una operación apropiada de los siguientes parámetros: Tiempo de Retención Hidráulica (TRH), Tiempo de Retención de los Lodos (TRL) y tipo de inóculo (Oz *et al.*, 2012).

En México, los digestores de lodos anaerobios construidos operan bajo condiciones mesofílicas (35 °C), o en rango termofílico de (55 °C), ambas temperaturas aumentan el grado de destrucción de sólidos orgánicos al separar la fase sólida y la fase líquida. Sin embargo, estos procesos tienen limitada hidrólisis de materia orgánica con biodisponibilidad mínima de materiales orgánicos solubles durante la estabilización, la cual se origina al emplear métodos químicos como ácidos minerales fuertes o álcalis del tipo óxido de calcio (CaO) e hidróxido de calcio (Ca(OH)₂).

En el caso de los reactores con dos fases de digestión anaerobia, cada una tiene su producción de lodos (primario y secundario), lo cual facilita estabilizar y solubilizar la materia orgánica así como, reducir los microorganismos patógenos contenidos en reactores alimentados con flujo ascendente (Terreros *et al.*, 2009).

Metodología

Para el presente estudio el digestor utilizado es de forma rectangular, contiene cuatro cámaras con un volumen total de operación de 1 m³, la primera cámara actúa como un sedimentador principal donde comienza a llevarse a cabo el proceso por biodigestión, mientras en el cuarto compartimiento se complementa el proceso de sedimentación continuando la digestión anaerobia.

La puesta en operación del biodigestor requirió instalar un baipás en la descarga de un sanitario y una

alcantarilla, ingresando poca cantidad de aire al descargarse el agua residual al prototipo.

La construcción del prototipo se llevó a cabo en un lugar poco soleado al norponiente de la zona metropolitana en la Ciudad de México, en su elaboración fueron utilizadas placas de ferrocemento con 5 cm de espesor; donde cada placa separa el siguiente compartimiento (ver figura 1), dicho digestor es de fácil construcción, manejo y mantenimiento.

Este reactor es de flujo horizontal, en su diseño se ocupó el principio de vasos comunicantes para evitar gasto de energía, de tal manera que la cantidad de agua que entra es la misma que sale en forma libre, manteniendo el equilibrio hidrológico.

Una vez finalizada la construcción del digestor, se procedió a impermeabilizarlo con una disolución a base 500 g de hidróxido de calcio (cal hidratada) y 50 g sal yodurada. La mezcla se aplicó en las paredes interiores, se dejó secar y se concluyó con un reposo de 2 semanas con una solución de cal al 10 % antes de proceder al llenado para comenzar con el funcionamiento, en este caso la carga.

El llenado tuvo una duración de cinco meses, en dicho periodo se realizó la etapa de prueba, donde se realizaron mediciones del caudal con un promedio de carga de 20.78 L/día (agua, orina, materia fecal y residuos de jabón).

El plan de muestreo fue formulado para caracterizar el agua residual y evaluar el proceso del agua sometida al tratamiento durante la carga del biodigestor, acorde a los parámetros de campo establecidos por la normatividad oficial mexicana (NMX-AA-003-1980); seleccionando las siguientes variables de campo: sólidos sedimentables, temperatura, pH, conductividad eléctrica y oxígeno disuelto.

Dichas determinaciones se realizaron en un total de 50 muestras, por cada prueba a realiza en cada punto

de monitoreo, dos veces por semana en horarios matutinos hábiles preestablecidos.

La determinación de Sólidos Sedimentables (S.S) se desarrolló mediante la técnica de sedimentación en Conos Imhoff (NMX-AA-004-SCFI-2000), la lectura se tomó directamente del cono, en este caso solamente se realizó una medición por muestra.

La determinación de Temperatura (T °C) del agua fue medida en campo con un termómetro TC-2 calibrado, de vidrio con relleno de mercurio (marca Taylor®, rango -20 a 110 °C, serie: 6332) en 100mL de muestra de agua, en la entrada y salida del proceso de acuerdo al método (NMX-AA-007- SCFI-2000 y APHA, AWWA, 1995) la determinación se realizó por triplicado y finalmente se trabajó con los valores promedio por muestra.

La determinación de pH se realizó de acuerdo a la norma mexicana (NMX-AA-008-SCFI-2011 y APHA, AWWA, 1995), lo que requirió tomar 500mL de muestra en los puntos de entrada C-1 y salida C-4 del proceso a temperatura ambiente, con un equipo medidor de pH (pH-Meter, marca CONDUCTRONIC®, modelo PC-18, rango 0-14 \pm 0.02) calibrado con soluciones amortiguadoras de pH 7.00 y 10.00 (marca J.T. BAKER®), posterior a la calibración se realizaron las mediciones por triplicado y solamente se usaron los valores promedio para la evaluación de dicho parámetro.

El análisis de Conductividad Eléctrica (C.E) se evaluó con conductímetro por triplicado (marca CONDUCTRONIC®, modelo PC18, serie 3212, rango 1-999.9 μ S/cm; 1-99.99 mS/cm, con una tolerancia de 0.1 μ S/cm), según el método estándar (NMX-AA-093-SCFI-2000 y APHA, AWWA, 1995), se tomaron los valores promedio para la evaluación del funcionamiento del digestor.

La medición del Oxígeno Disuelto (O.D), siguió el procedimiento yodométrico descrito en la (NMX-AA-012-SCFI-20011).

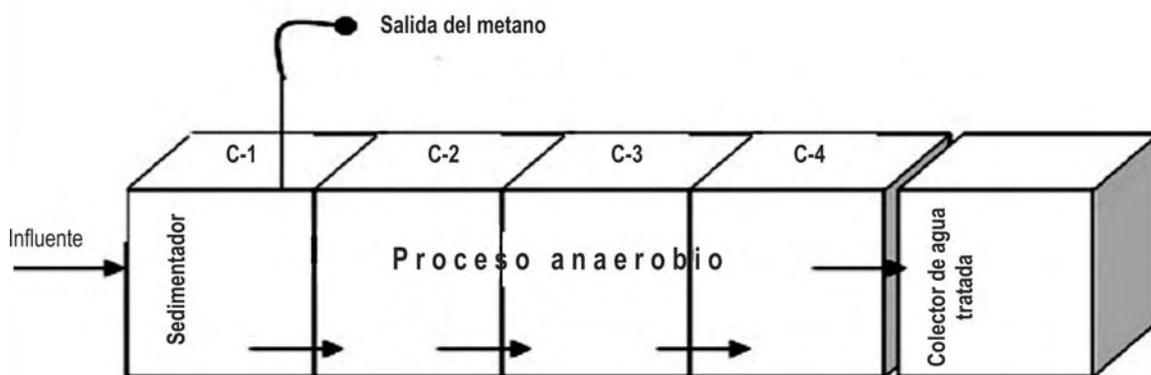


Figura 1. Biodigestor: Diagrama del Biodigestor rectangular de cuatro cámaras, la inyección del influente a tratar se realiza por la pared lateral en la parte superior de C-1 para que en el interior, el flujo transite en forma horizontal en la parte inferior de las cámaras, una vez finalizado el tratamiento el efluente sale en forma libre y se recupera en un colector exterior.

Resultados y discusión

Los datos de campo obtenidos de cada variable se conjuntaron en una tabla de frecuencias, fueron agrupados así como ordenados para ser tratados con la estadística tradicional en Excel y ser interpretados los gráficos con Origin 6.1 con su respectivo ajuste y ser interpretados con un modelo Lorenziano para las variables de campo (S.S, temperatura, pH, C. E y O.D) del influente a tratar en el biodigestor anaerobio de cuatro cámaras durante el periodo de carga.

Los mencionados gráficos muestran mediante la línea continua los datos obtenidos, mientras que la línea de puntos indica el ajuste realizado.

La información de las figuras se complementa con los resultados mencionados en la tabla (1), donde aparecen las siguientes medidas estadísticas: la media estadística, desviación estándar, coeficiente de variación, por ciento de coeficiente de variación, moda, máximo, mínimo, promedio y varianza de cada medición.

integran sólidos inertes como arcilla y arena procedentes de los escasos escurrimientos externos al sanitario.

Esta composición es característica del agua cruda proveniente del sanitario de prueba, dicho influente se inyecta en un volumen aproximado de 0.02013 m³/día en C-1, su ingreso es por caída libre en forma intermitente originando una sedimentación inicial, lo que facilita la acumulación de sólidos así como el aumento de lodos dentro del reactor, esto evita la pérdida de sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) (Ghani *et al.*, 2013).

Como consecuencia la materia orgánica disminuye parcialmente en nutrientes y en oxígeno disuelto presentes en los sedimentos. Este consumo es realizado por la microflora nativa de las partículas (Haller *et al.*, 2009), la cual tiene dos capas que forman el lecho de lodos al fondo del compartimiento y al no estar expuestos a una agitación pesada se obtiene una buena formación del lecho anaeróbico (Lettinga *et al.*, 1995).

Tabla 1. Concentración de datos estadísticos

		Media Est.	DS	CV (%)	CV	Moda	Máximo	Mínimo	Promedio	Varianza
S. S	C-1	143.5	95.550	66.11	0.661	100.0	450	36.0	144.5	-
	C-2	7.7	7.882	-	-	3.0	40	2.3	8.7	-
	C-3	0.1	2.840	-	-	0.0	18	0.0	1.1	7.906
	C-4	0.1	0.069	-	-	0.0	0.40	0.0	0.02	0.005
Temp.	C-1	18.24	1.684	8.75	0.087	21.3	21.7	16.0	19.2	2.780
	C-2	18.43	1.729	8.90	0.089	22.6	22.6	16.4	19.4	2.970
	C-3	18.67	1.490	7.57	0.075	22.3	22.3	17.1	19.6	2.203
	C-4	19.14	1.816	9.02	0.090	21.2	23.6	16.30	20.1	3.232
pH	C-0	8.05	1.222	15.18	0.151	8.17	9.28	6.72	8.03	1.465
	C-1	7.59	0.325	3.78	0.037	8.77	9.36	8.06	8.60	0.103
	C-2	7.34	0.359	8.99	0.089	8.53	9.21	8.30	7.38	0.109
	C-3	7.27	0.274	3.32	0.033	8.32	9.26	8.20	7.66	0.056
	C-4	7.42	0.103	1.23	0.012	8.77	8.43	8.47	8.43	0.010
C. E	C-0	1539.34	428.970	27.86	0.278	1868	2290	979	1510.83	-
	C-1	1386.36	342.828	24.71	0.247	1624	2106	563	1387.00	-
	C-2	1001.88	158.436	15.79	0.157	1256	1386	758	1002.88	-
	C-3	1004.72	216.535	21.53	0.215	956	1628	690	1005.72	-
	C-4	1206.54	122.001	10.10	0.101	1376	1376	1152	1207.00	-

(C-0) corresponde a la alcantarilla, (C-n) indica el número de cámara, (T°C) Temperatura, pH, (C.E, µS/cm) Conductividad Eléctrica, (S.S, mL/L) Sólidos Sedimentables

Contenido de Sólidos Sedimentables (S.S mL/L)

Se observó que del 100 % de los S.S, el 80 % de los elementos precipitados lo constituyen sólidos biodegradables fermentables no degradados en su totalidad, provenientes de la materia fecal y el 20 % restante lo

A lo largo del muestreo se observó que la concentración de S.S presentó variaciones cíclicas dependientes de la cantidad de materia orgánica disponible, considerando que 1/3 parte de los S.S del influente están constituidos por materia orgánica (Van Andel y Kato,

2006), y su abastecimiento no es constante en el biodigestor.

El monitoreo se efectuó a la entrada C-1 del biodigestor en dos periodos cada uno de 25 días figuras 2(A) y 2 (B), mientras que el total correspondientes a 50 días de forma continua se grafican en C-4 figura 2(C). Estos resultados muestran en la figura 2 (A) sesgos en los primeros 25 días de los S.S donde se registró un intervalo de 151.51 mL/L - 247.53 mL/L, encontrando el mayor número de concentraciones en 174.44 mL/L - 201.59 mL/L los cuales reflejan la inestabilidad del sistema en sus inicios durante el primer periodo de carga.

Estas cantidades de S.S se modificaron a lo largo de los meses hasta completar el llenado del digestor, en el gráfico mostrado en la figura 2 (B). El comportamiento

durante este lapso mostró una concentración constante en un valor de 45.55 mL/L, para después incrementarse rápidamente a 55.28 mL/L como se observa en el tercer pico y llegar a un máximo del ciclo en 99.87 mL/L de S.S. El valor máximo de los S.S indica la presencia de un número alto de microorganismos en los lodos, dicha cantidad decrece en una etapa posterior reflejándose en el mínimo de S.S donde los sólidos se encuentran en escasa cantidad que al no ser agitados evita sólidos en suspensión (Hanna *et al.*, 2014), produciendo un efluente de color ligeramente gris-ámbar.

Al continuar la circulación del agua tratada de la primer cámara mediante flujo horizontal a C-2, se estimó una disminución del 93.97 % en la concentración de S.S en C-2, se observaron S.S de característica granulo fino, pequeño de color gris-café, (sin materia orgánica) de fácil

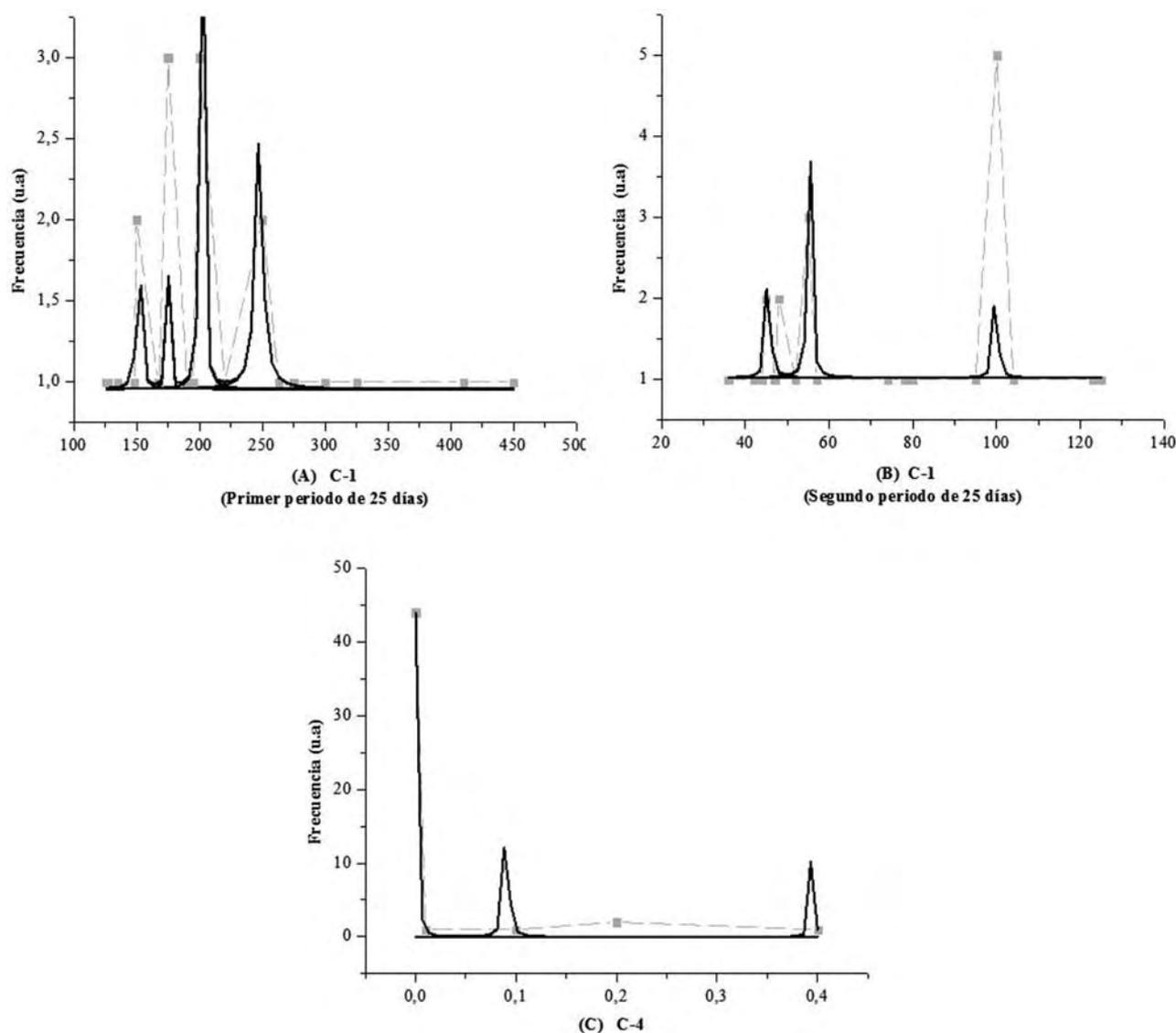


Figura 2. Gráficos de Sólidos Sedimentables (A) y (B) pertenecientes a la cámara uno C-1 muestran el resultado obtenido del muestreo de 50 días dividido en dos periodos de 25 días cada uno, mientras que (C) es concerniente a C-4

sedimentación, el líquido presenta color ligeramente gris con predominio ámbar. Este caudal fluye a C-3 donde la cantidad de S.S se apreció como un limo gris en cantidad despreciable y el agua tratada adquiere un color ámbar.

Al pasar el agua en tratamiento a C-4 (salida) las características del efluente no se alteraron severamente en relación al líquido contenido en la C-3; sin embargo existe una variación en los componentes de los S.S constituidos por materia orgánica, nutrientes, minerales y oxígeno disuelto por acción de la microflora (Haller *et al.*, 2009), así como por los efectos de la sedimentación de la tres primeras cámaras y del proceso anaerobio al que se sometió el agua cruda. Estos cambios se aprecian en el tipo de sedimento donde los S.S forman un limo fino de color gris claro en escasa cantidad, mientras que el efluente conservó su color ámbar.

Dicha información se complementa con los datos estadísticos en la última cámara (C-4), cuyo ajuste se realizó con un modelo Lorentziano obteniendo una $R^2 = 0.9974$. Lo que respecta a los valores experimentales de S.S arrojaron una concentración máxima de 0.40 mL/L y una mínima de 0.0 mL/L (ver tabla 1).

El gráfico mostrado en la figura 2 (C), muestra la estabilidad del sistema con una importante disminución de materia orgánica así como el tipo de sólido presente en esta cámara.

En este punto el registro del mayor número de repeticiones en el valor mínimo reveló variaciones despreciables, el limo sedimentado no mostró cambio en textura manteniendo uniforme su color café-gris pese a los cambios en las variables ambientales del momento, logrando

obtener resultados dentro de los límites máximos permisibles señalados por la NOM-001- SEMARNAT-1996 para agua tratada, utilizada en riego agrícola.

Temperatura (T °C)

La carga del biodigestor, se realizó en los meses de agosto a diciembre que corresponden al periodo de precipitación pluvial y descenso de frentes fríos estacionales del año, provocando ligeras filtraciones de agua lluvia en la alcantarilla de entrada al digestor, mañanas frías acompañadas de tardes calurosas. Las condiciones ambientales mencionadas y la ausencia de dispositivos reguladores de temperatura en el sistema, pueden propiciar variaciones térmicas que afecten los mecanismos cinéticos del proceso así como el rendimiento (Donoso *et al.*, 2009) del sistema, considerando la estrecha dependencia de esta variable en los parámetros cinéticos.

En el transcurso del llenado del biodigestor se estableció un rango específico de temperatura el cual favoreció la presencia de poblaciones bacterianas específicas de bajas temperaturas, mismas que pueden verse afectadas ante cambios severos de la variable (Pervin *et al.*, 2013), modificando sus rutas de proceso (Rizvi *et al.*, 2013) así como la reducción en la absorción y la biodegradación de los micro-contaminantes (Kopittke *et al.*, 2004).

El influente de C-1 tuvo un intervalo de operación entre $16\text{ °C} \pm 0.44$ a $21.2\text{ °C} \pm 0.03$ ver figura 3 (D); el cual no afectó los valores obtenidos en la sedimentación, pH o CE, estos valores se presentan específicamente

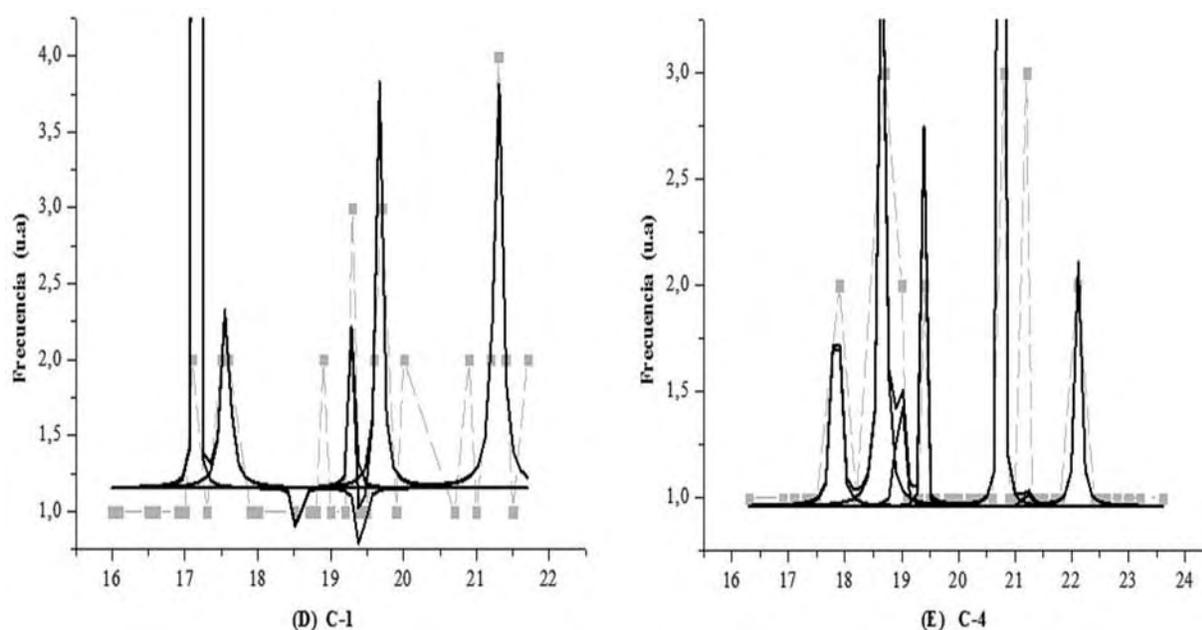


Figura 3. Gráficos de Temperatura: El gráfico (D) muestra el comportamiento de temperatura durante 50 días del muestreo en la cámara uno (C-1), mientras que la figura (E) describe las fluctuaciones de temperatura en el intervalo señalado de la cámara C-4.

mente en la digestión anaerobia psicrófila (≤ 20 °C) (McKeown *et al.*, 2012).

Su característica es producir una alta acumulación de sólidos en suspensión en el lecho (Chong *et al.*, 2012; Lettinga *et al.*, 1995), formación de gránulos incompletos, poco volumen de sólidos, menor actividad metanogénica de los microorganismos presentes en los lodos, disminuyendo la hidrólisis y la tasa de consumo del sustrato (McKeown *et al.*, 2012), como es el caso de este proceso donde el influente muestra un color ámbar así como la presencia de sólidos en suspensión causando ligera turbiedad en las cuatro etapas del proceso, encontrando un promedio de 19.43 °C para C-2 y de 19.67 °C para C-3 (ver tabla 1), estos valores indican una aceleración del proceso así como una mayor degradación de la materia orgánica.

Al llegar el efluente a C-4, se definió el rango de temperatura del proceso entre 17.8 °C \pm 2.83 y 22.1 °C \pm 0.28 ver figura 3 (E), este intervalo pertenece a una población bacteriana psicrófila anaeróbica cuyo ambiente óptimo de temperatura es de 15 °C a 25 °C (McKeown *et al.*, 2012).

En el transcurso del muestreo los intervalos de temperatura se asocian esta variación a los grupos microbianos, su actividad correspondiente y la rapidez del proceso, el cual al terminar permitió que la temperatura del efluente final se encontrara dentro de los límites permisibles de la NOM-001-ECOL-1996 para la descarga.

pH

El influente que transita a través de C-0 (alcantarilla) para alimentar a C-1 del digestor está sujeto a las siguientes variables ambientales como: la temperatura, los ligeros escurrimientos de tierra, la cantidad y la composición de excretas humanas, mismas que impactan significativamente en la calidad del agua cruda para reflejarse en los valores reportados de los parámetros seleccionados como el caso del pH.

En la figura 4 (F), para C-0 se muestran un comportamiento estadístico lineal donde las variaciones de unidades de pH con frecuencia de dos dentro registran los picos en un intervalo amplio de 7.1 a 8.02 \pm 0.007 como resultado del impacto de las variables ambientales a las que el proceso estuvo sujetas durante el periodo experimental.

En las primeras mediciones se encontraron variaciones de pH neutro a ligeramente básico donde el valor máximo es 7.88 \pm 0.23, aquí se establece un rango estrecho con varios picos entre 7.88 \pm 0.237 y 8.02 \pm 0.007, condiciones que favorecen el inicio de la fermentación (Corbitt *et al.*, 2003), manteniendo un intervalo predominante de pH 8 que no afecta el influente (SEMARNAT *et al.*, 2010) y no requiere ajuste alguno del agua residual antes de cargar el prototipo, además que este valor cubre las condiciones de descarga en

alcantarillado urbano estipuladas por NOM-002-SEMARNAT-1996.

Al descargar el agua cruda en C-1 se observó un incremento del pH que define y al mismo tiempo establece un rango para estabilizar el sistema entre 8.31 \pm 0.034 y 8.77 \pm 0.001 (Covarrubias *et al.*, 2011), donde se produce un proceso de alcalinización ver figura 4 (G) como resultado de la producción de carbonatos a partir de la materia orgánica carbonada para transformarse a Ácidos Grasos Volátiles (AGV) y carbonatos, sin producir una completa mineralización (Cervantes *et al.*, 2011).

Estos cambios de pH también se asocian a los cambios en las comunidades bacterianas con respecto al tiempo (McCleskey *et al.*, 2012), de acuerdo al ciclo de vida para cada grupo de microorganismos, se ha reportado una relación entre el aumento de pH y la presencia de *E. coli*. (McLaughlin *et al.*, 2012) en el agua sometida a este tipo de tratamiento.

Este líquido continuo a C-2, donde se registro una disminución del pH alcanzando un promedio de 7.38, para que en C-3 se incremente el pH a 7.66 resultando en ambos compartimientos valores neutros, los cuales no tuvieron fluctuaciones significativas durante la fase experimental considerando una pequeña diferencia entre los datos (ver tabla 1). Lo cual sugiere que las condiciones características de los compartimientos favorece la presencia de grupos microbianos específicos aclimatados para continuar el proceso depurativo de tipo anaeróbico.

Una vez que llega el agua a C-4, nuevamente el influente entra en un proceso de alcalinización donde la diferencia de pH es de 0.1 con relación a C-1, y el intervalo más estrecho de C-4 registra un pH de 8.24 \pm 0.41 a 8.50 \pm 0.12 ver figura 4(H), aquí se aprecia la misma frecuencia en las fluctuaciones de estos valores. Esto sugiere un balance entre todos los microorganismos del tratamiento anaerobio propios de esta etapa, así como un equilibrio de los carbonatos presentes en el efluente y una baja concentración de AGV (McKeown *et al.*, 2012).

Al observar los resultados de las cuatro cámaras, no se encontraron modificaciones significativas de las lecturas ante la dilución generada por las precipitaciones pluviales propias de la temporada, los descensos de temperatura matutinos como consecuencia de los frentes fríos correspondientes, lo anterior indica que encontramos un sistema estable ante las variables ambientales y el efluente de descarga se encuentra dentro del rango de pH señalado por la NOM-002- SEMARNAT-1996 cubriendo las condiciones para descarga de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano.

Conductividad Eléctrica (C.E. μ S/cm)

En la alcantarilla el resultado de conductividad eléctrica (C.E.), presentó un solo pico de 1863.02 μ S/cm,

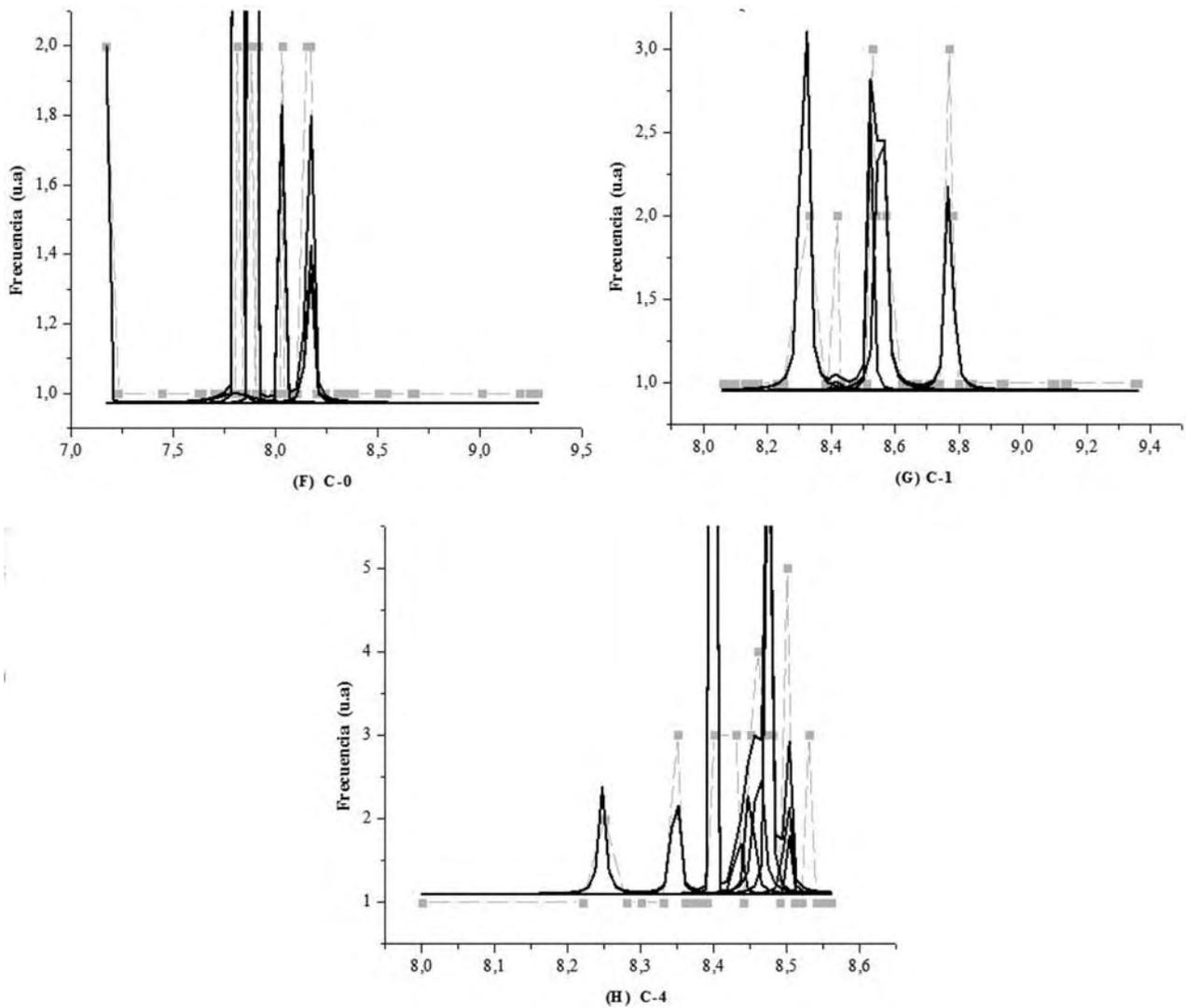


Figura 4. Gráficos de pH: El gráfico (F) alcantarilla (C-0) muestra el comportamiento del pH antes ingresar al biodigestor. En el gráfico (G) cámara uno (C-1), indica el pH del inicio del proceso. Mientras que el gráfico (H) cámara cuatro (C-4), indica variaciones del pH en un rango alcalino.

como se observa en la figura 5 (I), un máximo de 2290 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y un mínimo de 979 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (ver tabla 1) muestra una frecuencia continua entre estos valores que indican: salinidad, fuerza iónica, concentraciones de soluto y concentraciones de sólidos disueltos totales (McCleskey *et al.*, 2012) presentes en agua cruda. Estos datos se encontraron por debajo del rango de 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ establecidos por la NOM-CCA-032-ECOL/1993, la cual regula las condiciones para descargas que van al alcantarillado urbano o municipal, para este caso en particular el agua residual que alimenta a C-1 del biodigestor.

En la primera cámara C-1 del sistema, se recibe el influente donde se origina la sedimentación e inicia el

proceso alcalino con baja carga orgánica, también se encuentra una C.E. con un comportamiento estadístico lineal, cuyos iones disueltos en solución forman un pico de 1621.9 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ver figura 5(J), un máximo de 2106 $\mu\text{S}/\text{cm}$, un mínimo 563 $\mu\text{S}/\text{cm}$ así como un promedio de 1387 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (ver tabla 1); no se observaron intervalos o variaciones intensas que reflejaran un impacto originado por las condiciones ambientales correspondientes al día de estudio.

El paso del influente a C-2 registró un máximo de 1386 $\mu\text{S}/\text{cm}$, un mínimo de 758 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y un promedio de 1002.88 $\mu\text{S}/\text{cm}$; mientras que en C-3 se estimó un máximo de 1628 $\mu\text{S}/\text{cm}$, un mínimo de 690 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y un promedio de 1005.72 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (ver tabla 1); obser-

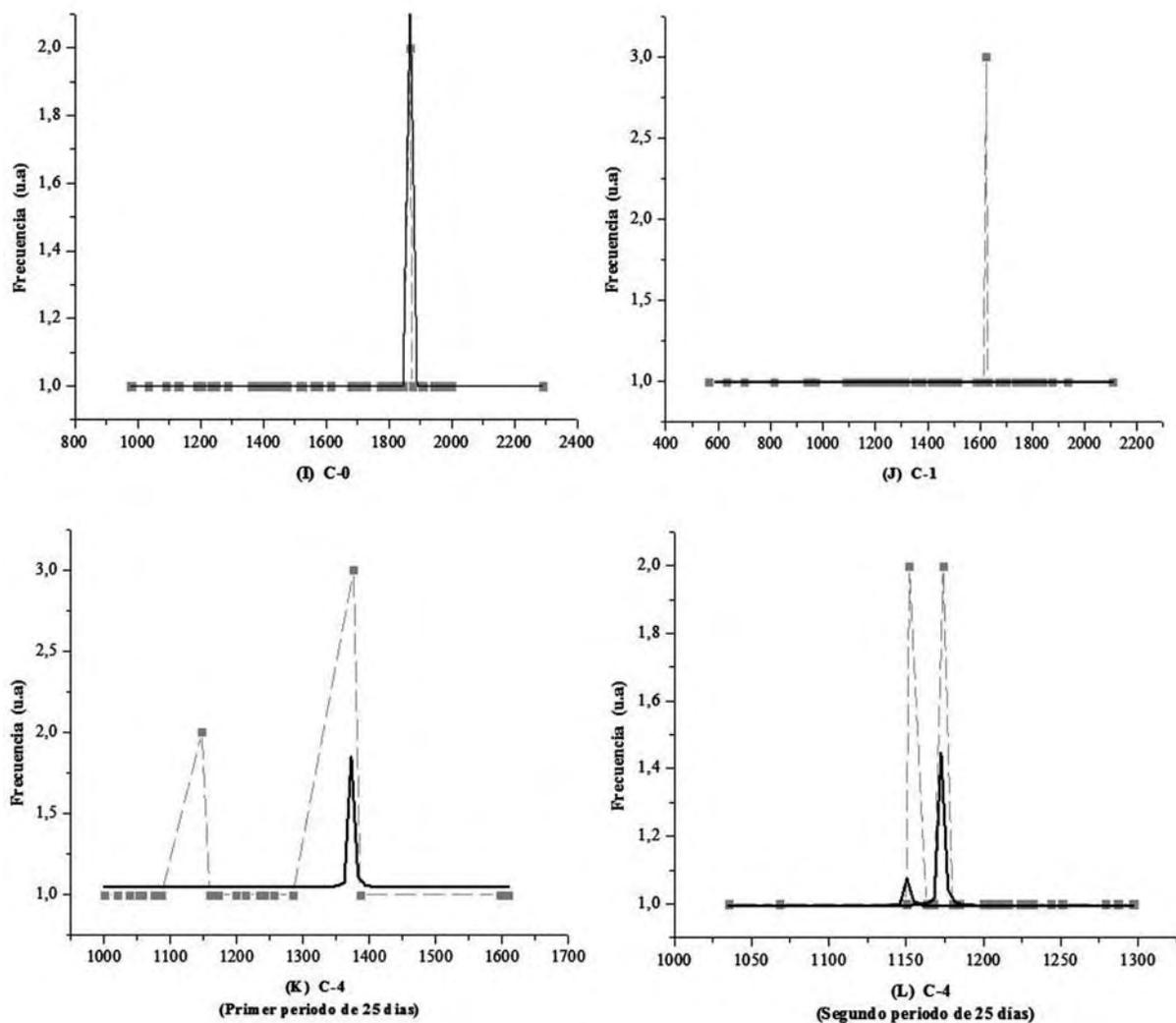


Figura 5. Gráficos de Conductividad Eléctrica: El gráfico (I) muestra los datos de C.E en el flujo de la alcantarilla (C-0). La grafica (J) muestra un comportamiento lineal de las lecturas en C-1. Mientras que los gráficos (K) y (L), refieren valores menores de C. E en C-3 y C-4.

vando una ligera apertura en el intervalo de valores entre ambos compartimientos, con aumento para C-3 lo cual indica una mayor disponibilidad de iones disueltos para el proceso.

En el C-4 se maneja un rango de $1151.6 \mu\text{S}/\text{cm} \pm 9.2$ - $1173.60 \mu\text{S}/\text{cm} \pm 1.32$ de C.E. ver figura 5(L). Estas ligeras fluctuaciones se asocian con la presencia de carbonatos, mientras que las variaciones de temperatura en esta cámara, también tuvieron influencia del suministro de calor externo procedente de las horas de sol irradiado sobre la tierra circundante al digestor, lo cual influyó sobre las reacciones propias de la biodigestión y por consiguiente en la C.E, permitiendo obtener el valor promedio dentro del límite máximo permisible la de $2000 \mu\text{S}/\text{cm}$, señalada por la NOM-CCA-032-ECOL/1993 para agua tratada destinada a riego agrícola.

Oxígeno Disuelto (O.D mg/L)

En el transcurso del primer momento experimental correspondiente a la carga del reactor, se efectuaron mediciones del O.D, variable que indica el nivel de contaminación en relación con la calidad del agua (Reza *et al.*, 2014).

Encontrando en la figura 6(M) 1 de C-1 a la entrada, escasa variación en la concentración del mencionado parámetro con promedio de $4.5992 \text{ mg}/\text{L}$, máximo de $4.8109 \text{ mg}/\text{L}$ y mínimo de $4.4206 \text{ mg}/\text{L}$, como resultado de los siguientes factores: la adaptación de los grupos microbianos a condiciones específicas como es la temperatura (Chelme *et al.*, 2008), la calidad de los lodos (Vlad *et al.*, 2012) y las cargas de oxígeno en el sistema (Botheju *et al.*, 2009) en el momento del llenado donde se tiene una mayor proporción de aire

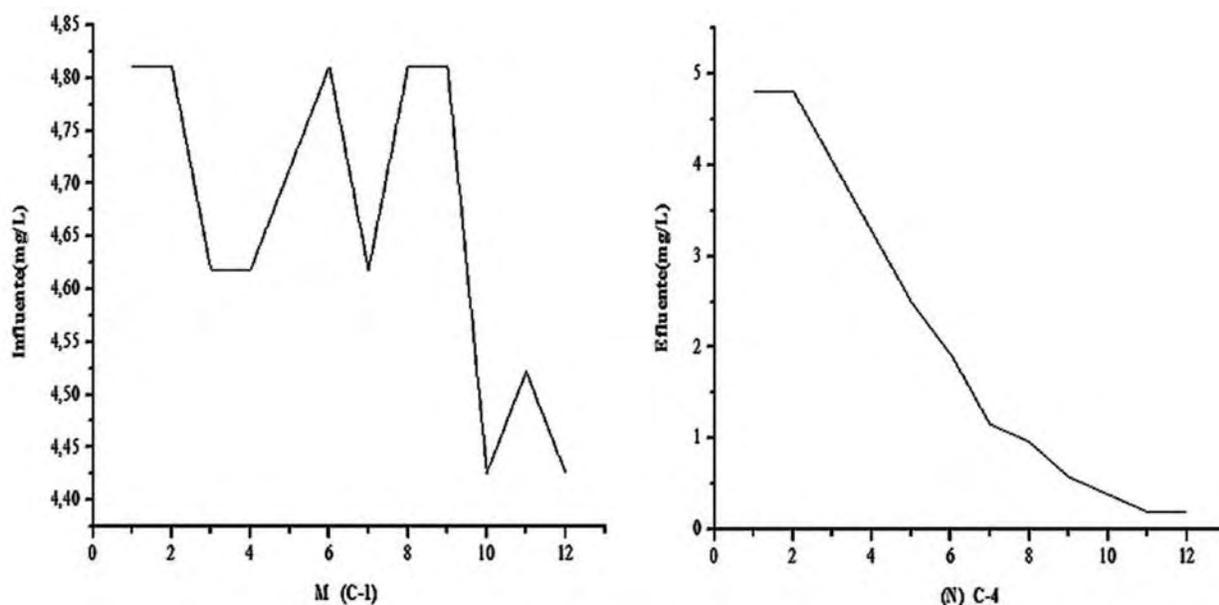


Figura 6. Gráficos de Oxígeno Disuelto. (M) corresponde a C-1 muestra la variación en la concentración de O. D, mientras que (N) concierne a C-4 se aprecia el decrecimiento del valor de O. D.

en el biodigestor en relación al volumen de influente suministrado.

Pese a que el agua residual suministrada tiene un contenido de materia orgánica rica en nutrientes, los cuales favorecen el crecimiento acelerado de los microorganismos (Ramhalo *et al.*, 2003), estos necesitan un tiempo mayor para aclimatarse hasta tener un lodo característico.

Por lo que la acumulación de sustrato puede ser un mecanismo ante la presencia de nitrito, cuando se identifica O.D anóxico o de baja concentración durante el periodo alimentación del reactor (Chelme *et al.*, 2008); considerando que el oxígeno tiene una media de saturación la cual va a depender de la densidad en la biomasa, tamaño de los flóculos así como la velocidad de difusión del oxígeno (Van Hulle *et al.*, 2010).

Sin embargo, el recorrido el agua en tratamiento a través de las cámaras del biodigestor concluye en C-4 donde el muestreo indicó las siguientes mediciones: promedio 2.0205 mg/L, máximo 4.8109 mg/L y mínimo 0.1924 mg/L, este último valor se considera importante por haberse completado la carga del digestor, así como ser la concentración menor de O.D misma que indica las condiciones anaerobias del reactor, dichos valores se aprecian en la figura 6(N).

En este gráfico, se observa en los primeros monitoreos valores alrededor de cuatro, lo cual sugiere la presencia de oxígeno disuelto en el transcurso del proceso de nitrificación, donde el oxígeno actúa como aceptor

de electrones en la reacción bioquímica (Mahdi *et al.*, 2013).

No obstante el valor mínimo del líquido en C-4 indica la formación de lodos a baja concentración de O.D (Chelme *et al.*, 2008), y conforme sigue bajando la concentración, no hay oxígeno disponible, sin embargo, la degradación anaeróbica continúa por acción de microorganismos anaerobios (Al-Hashimi *et al.*, 2013).

Conclusiones

Durante el periodo de carga del prototipo de escala real, las diferencias significativas se tienen entre C-0 (alcantarilla) y C-1, donde la variación del pH y la C.E, muestran el cambio positivo para el proceso, debido a que se presenta una disminución en las lecturas de pH y conductividad del influente con respecto a C-0 en el momento que ingresa al sistema, lugar donde al inicio una disminución progresiva del O.D para dar paso al proceso de biodigestión anaerobia de baja temperatura.

La cual al ser constante no interfirió con la sedimentación cuya eficiencia se favoreció con el suministro intermitente del agua residual procedente de sanitario de prueba. Esto coadyuvó a una degradación satisfactoria en la materia orgánica en C-1, simplificando el proceso de biodigestión para las tres cámaras subsecuentes.

Lo anterior se refleja en el efluente de C-4 donde se obtuvo un lodo final de tipo limo originando una nueva

etapa del proceso con su particular película bacteriana continuando el tratamiento depurativo alcanzando el cumplimiento de las condiciones para la descarga en el sistema de alcantarillado estipuladas por la NOM-002- SEMARNAT-1996, NOM-002- SEMARNAT-1996 y la NOM-CCA-032-ECOL/1993 para concluir de esta manera la fase de llenado.

Con esto se concluye que es un sistema el cual cumple con la normatividad vigente para tratamiento de aguas residuales domésticas

Agradecimientos

Al Centro de Investigación e Innovación Tecnológica (CIITEC) perteneciente al Instituto Politécnico Nacional (IPN), por permitir instalar el digestor de capacidad real en sus instalaciones, así como el uso de material y equipo del Laboratorio de Control Ambiental para realizar las pruebas de laboratorio pertinentes y al Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca de estudios doctorales.

Referencias bibliográficas

- Al-Hashimi, M., Hussain, H. (2013). Stabilization Pond for Wastewater Treatment. *European Scientific Journal*, 9(14), 278-294
- APHA, AWWA & WEF. (1995). *Standard methods for examination of water and wastewater*. Washington, D.C., U.S.A. American Public Health Association
- Botheju, D., Lie, B., Rune, B. (2009). Oxygen Effects in Anaerobic Digestion. *Modeling, Identification and Control*, 30(4), 191-201
- Cervantes, A., Cruz, M., Aguilar, R., Castilla, P., Meraz, M. (2011). Caracterización Físicoquímica y Microbiológica del agua tratada en un reactor UASB escala piloto. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(1), 67-77.
- Corbit, R., (2003). *Manual de Referencia de la Ingeniería Ambiental*. España. Mc Graw Hill (Ed.): Tratamiento anaerobio, pp. 6.127-6.129.
- Cortois, R., De Deyn, G. (2012). The curse of the Black box. *Plant Soil*, DOI 10.1007/s11104-011-0963-z.
- Covarrubias, G., Camacho, A. (2011). Evaluación de un reactor de manto de lodo con flujo ascendente (UASB) con cambios de velocidad de alimentación. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 12(1), 199-208.
- Chelme, S., Fonseca, P., Mercado, R., Alarcon, N., Sánchez, O. (2008). Macromolecular composition and anaerobic degradation of the sludge produced in a sequencing batch reactor. *Electronic Journal of Biotechnology*, DOI: 10.2225/vol11-issue3-fulltext-12
- Chong, S., Kanti Sen, T., Kayaalp, A., Ming Ang, H. (2012). The performance enhancements of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors for domestic sludge treatment e A State-of-the-art-review. *Water Research*, 46, 3434 -3470.
- De la Peña, M., Ducci, J., Zamora, V. (2013). *Tratamiento de Aguas Residuales en México*. Banco Interamericano de Desarrollo <http://publications.iadb.org/handle/11319/5931?locale-attribute=es>. Accessed 20 January 2014.
- Donoso, A., Bandara, W., Satoh, H., Ruiz, G. (2013). Explicit temperature-based model for anaerobic digestion: Application in domestic wastewater treatment in a UASB reactor. *Bioresource Technology*, 133, 437-442.
- Ghani, N., Othman, N. (2013). Study on Characteristics of Sediment and Sedimentation Rate at Sungai Lembing, Kuantan, Pahang. *Procedia Engineering*, 53, 81- 92.
- Grady, L., M Filipe, M. (2000). Ecological Engineering of Bioreactors for Wastewater Treatment. *Water Air and Soil Pollution*, 123, 117-132.
- Haller, L., Amedegnato, E., Poté, J., Wildi, W. (2009). Influence of Freshwater Sediment Characteristics on Persistence of Fecal Indicator Bacteria. *Water Air and Soil Pollution*, 203, 217-227.
- Hanna, A., Allison, M., Bianchi, T., Marcantonio, F., Goff, J. (2014). Late Holocene sedimentation in a high Arctic coastal setting: Simpson Lagoon and Colville Delta, Alaska. *Continental Shelf Research*, 74, 11-24.
- Keser, G., & G. Buyuk. (2012). Effects of water irrigation on chemical and physical properties of *Petroselinum crispum*. *Biol. Trace Elem. Res*, DOI 10.1007/s12011-011-9259-7.
- Kopittke, P., Menzies, N. (2004). Control of nutrient solution for studies at high pH". *Plant and soil*, 266, 343-354.
- Lettinga, G. (1995). Anaerobic digestion and wastewater treatment system. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67, 3-28.
- Mahdi, A., Azni, I., Aofah, A. (2007). Combined anaerobic-aerobic system for treatment of textile wastewater. *Journal of Engineering Science and Technology*, 2(1), 55-69
- McCleskey, B., Nordstrom, D., Ryan, J., Ball, J. (2012). A new method of calculating electrical conductivity with applications to natural waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 77, 369-382.
- McKeown, R., Hughes, D., Collins, G., Mahony, T., O' Flaherty, V. (2012). Low-temperature anaerobic digestion for wastewater treatment. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 444-451.
- McLaughlin, M., Brooks, J., Adeli, A. (2012). Temporal flux spatial dynamics of nutrients, fecal and zoonotic pathogens in anaerobic swine manure lagoon waters. *Water Research*, 46, 4949-4960.
- Norma Oficial Mexicana NOM-002-SEMARNAT-1996 Que establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal.
- Norma Oficial Mexicana NOM-CCA/032-ECOL/1993, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las aguas residuales de origen urbano o municipal para su disposición mediante riego agrícola.
- Norma Mexicana NMX-AA-003-(1, 2, 3)-2008 Aguas residuales-Muestreo.
- Norma Mexicana NMX-AA-004-SCFI-2013 Análisis de agua - Determinación de Sólidos sedimentables en Aguas Naturales, Residuales y Residuales Tratadas.
- Norma Mexicana NMX-AA-007- SCFI-2013 Análisis de Agua - Determinación de la Temperatura en Aguas Naturales, Residuales y Residuales Tratadas.
- Norma Mexicana NMX-AA-008-SCFI-2011 Análisis de Agua-Determinación del pH-método de prueba.
- Norma Mexicana NMX-AA-012-SCFI-2001 Análisis de agua determinación de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas.
- Norma Mexicana NMX-AA-093-SCFI-2000 Análisis de Agua-Determinación de la Conductividad Electrolítica.

- Norma Técnica Ambiental NTA-006-SMA-RS-2006.- Que establece los requisitos para la producción de los mejoradores de suelos elaborados a partir de residuos orgánicos.
- Oz, N., & Ince, O. (2012). Effect of seed sludge microbial community and activity on the performance of anaerobic reactors during the start-up period. *World J Microbiol Biotechnol*, DOI 10.1007/s11274-011-0857-5.
- Panikkar, A., Okalebo, S. (2010) *Handbook of Environmental Engineering, Volumen 11: Environmental Biongeerir*L. (Ed.), L. K. Wang et al., DOI: 10.1007/978-1-60327-031-1_16.
- Pervin, H. M., Dennis, G. P. (2013). Drivers of microbial community composition in mesophilic and thermophilic temperature-phased anaerobic digestion pre-treatment reactors. *Water Research*, doi.org/10.1016/j.watres.2013.07.053
- Ramhalo, R., Jiménez, D., de Lora, F. (2003). *Tratamiento de aguas residuales*. España. Reverte. (Ed). Caracterización de agua residual doméstica e industriales, p. 40-41
- Reza, J., Jafar, M., Razieh, Y. (2014). The study and zoning of dissolved oxygen (DO) and biochemical oxygen demand (BOD) of Dez river by GIS software. *Journal of Applied Research in Water & Wastewater*, 1(1), 26-30
- Rizvi, H., & Ahmad, N. (2013). Start-up of UASB reactors treating municipal wastewater and effect of temperature/sludge age and hydraulic retention time (HRT) on its performance. *Arabian Journal of Chemistry*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arab-jc.2013.12.016>.
- Sarathai, Y., Koottatep, T., Morel, A. (2010). Hydraulic characteristics of an anaerobic baffled reactor as onsite wastewater treatment system. *Journal of Environmental Sciences*, 22(9), 1319–1326.
- SEMARNAT, SAGARPA, FIRCO. (2010). *Especificaciones Técnicas para el Diseño y Construcción de Biodigestores en México*. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Fideicomiso Riesgo Compartido. México Disponible en: Documento Especificaciones Técnicas VF – Proyecto de Energía_proyectedeenergíarenovable.com/.../Biodigestor/Especificaciones... Formato de archivo: PDF/Adobe Acrobat Accessed July 2012.
- Terreros, J., Olmos, A., Noyola, A., Ramírez, F., Monroy, O. (2009). Digestión anaerobia de lodo primario y secundario en dos reactores UASB en serie. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 8 (2), 153-161
- Torres, P. (2012). Perspectivas del tratamiento anaerobio de aguas residuales domésticas en países en desarrollo. *Revista EIA*. 18: 115-129
- Van Haandel, A., Kato, M., Cavalcanti, P., Florencio, L. (2006). Anaerobic reactor design concepts for treatment of domestic wastewater. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, DOI 10.1007/s11157-005-4888.
- Van Hulle, S., Vandeweyer, H., Meesschaert, B., Vanrolleghem, P., Dejjans, P., Dumoulin, A. (2010). Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams. *Chemical Engineering Journal*, 162, 1–20
- Vlad, C., Sbarciog, M., Barbu, M., Caraman, S., Vande Wouwer, A. (2012). Indirect Control of Substrate Concentration for a Wastewater Treatment Process by Dissolved Oxygen Tracking. *CEAI*, 14 (1), 37-47
- Wu, J., Meng, X., Meng Liu, X., Liu, X., Zheng, Z., Xu, D., Sheng, G., Yu, H. (2010). Life Cycle Assessment of a Wastewater Treatment Plant Focused on Material and Energy Flows. *Environmental Management*, DOI 10.1007/s00267-010-9497-z.

Comité evaluador

La Revista Colombiana de Biotecnología ofrece sus agradecimientos a los siguientes docentes quienes actuaron en el presente número como Comité de Arbitraje:

Abre Remedios, Daymi, MSc.,
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Sancti Spiritus,
Cuba, daymi.abreu@cigb.edu.cu

Aceves, Francisco,
Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, Unidad
Zacatenco, Instituto Politécnico Nacional, México,
aceves5@gmail.com

Acosta-Rodríguez, Ismael,
CIEP. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma
de San Luis Potosí, México, iacosta@uaslp.mx

Almeyda León, Isidro Humberto,
PhD., MSc., INIFAP CIR-NORESTE, México,
almeyda.isidro@inifap.gob.mx

Alvarado Rosales, Dionicio,
PhD., Profesor Investigador Adjuvante, Colegio de Postgraduados,
México, dionicio@colpos.mx

Amézquita, Claudia,
cPhD., MSc Ingeniera Sanitaria y Ambiental, Universidad del
Valle, Colombia, claudia.patricia.amezquita@gmail.com

Aragón, Oscar,
Ing., MSc, cPhD, Grupo de Bioprosesos y Bioprospección,
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia,
Colombia, oscarleo1@yahoo.com

Bedoya Mejía, Oswaldo,
MSc., Docente de Industrias Pecuarias y Zootecnia,
Corporación Universitaria Lasallista, Colombia,
osbedoya@lasallistadoctores.edu.co

Bernal, Mauricio,
MSc., cPhD Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional de Colombia, Colombia,
jmbernalmo@unal.edu.co

Buitrago Hurtado, Gustavo, IQ, MSc., Instituto de
Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia,
gbuitragoh@unal.edu.co

Bustamante R., Silvia L.,
MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de
Colombia, Sede Bogotá, Colombia, sbustamante@unal.edu.co

Cañizares Villanueva, Rosa Olivia,
PhD., Departamento de Biotecnología y Bioingeniería,
CINVESTAV-IPN, Instituto Politécnico Nacional, México,
rcanizar@cinvestav.mx

Cassan, Fabricio Darío,
PhD., Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto,
Argentina, fcassan@exa.unrc.edu.ar

Castiblanco Rodríguez, Ana Lucía,
QF., MSc Toxicología, Coordinadora Lab. Análisis Instrumental,
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia,
Colombia, alcastiblanco@unal.edu.co

Cerón Rincón, Laura E.,
MSc., cPhD, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional
de Colombia, Sede Bogotá, Colombia, leceron@unal.edu.co

Comba González, Natalia Beatriz,
MSc, cPhD Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de
Colombia, Colombia, natalia.comba@gmail.com

Cordero G, Eugenia,
PhD., Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica, Costa
Rica, eugenia.corderogarcia@ucr.ac.cr

Corredor, Gloria,
MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de
Colombia, Colombia, gacorredorh@unal.edu.co

De la Cruz Leyva, María Concepción,
PhD., División Académica Multidisciplinaria de los Ríos,
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México,
concepcion.delacruz@Ujat.mx

De Las Heras, F. Xavier,
PhD., Universitat Politècnica de Catalunya, Department
of Mining Engineering and Natural Resources, España,
heras@emrn.upc.edu

Escalona Morgado, Maritza,
PhD, Head of Cell and Tissue Culture Lab, Bioplant Center,
Cuba, mescalona@bioplantas.cu

Espéron, Patricia,
PhD., Biología Molecular Facultad de Química, Universidad de
la República, Uruguay, pesperon@fq.edu.uy

García Cabana, Andrea Carolina,
MSc., Escuela de Ciencias Agrícolas Pecuarias y del Medio
Ambiente, ECAPMA, Universidad Nacional Abierta y a
Distancia (UNAD), CEAD Tunja, Colombia,
andrea.garcia@unad.edu.co

García Romero, Ibonne Aydee,
MSc., PhD., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional
de Colombia, Colombia, ibonne@gmail.com

García, Cesar Edwin,
MSc., PhD., Red Colombiana de Reservas Naturales
de la Sociedad Civil, Colombia, cesaredwin@gmail.com

García-Pereyra, Jesús,
PhD., Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana, Durango,
México, jpereyra5@hotmail.com

Gil, José Fernando,
PhD., Department of Plant Biology, Uppsala BioCenter SLU,
Sweden, Jose.Fernando.Gil@slu.se

Gonçalves Nader, Diogo,
MSc., PhD., Departamento de Agronomia, Universidade
Federal Rural de Pernambuco (DEPA/UFPE), Brasil,
dgneder@hotmail.com

González Sáyer, Sandra Milena,
MSc. Microbiología, Lab de marcadores moleculares, Instituto
de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia,
Colombia, milenasayer@gmail.com

Guevara, Miguel,
PhD., Lab. de Biotecnología de Microalgas, Departamento
de Biología Pesquera, Instituto Oceanográfico de Venezuela,
Universidad de Oriente, Venezuela, miguevara2003@yahoo.es

Gutkind, Gabriel O.,
MSc., PhD Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de
Buenos Aires, Argentina, ggutkind@fiyf.uba.ar

Hernández Rodríguez, Ania,
PhD., Directora de Ciencia y Técnica, Universidad de La
Habana, Cuba, ania@fbio.uh.cu

López-Aranda, Jose Manuel,
PhD., Universidad de Málaga, España, ferpliego@uma.es

Maiale, Santiago,
PhD., IIB-INTECH, Chascomús, Buenos Aires, Argentina; PMGA
FCAyF, Universidad Nacional de la Plata, Argentina,
smaiale@intech.gov.ar

Martina, Pablo E.,
PhD., Grupo de Investigación de Energías Renovables, Facultad
Ingeniería, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina,
pablo@ing.unne.edu.ar

Martínez de la Parte, Einar,
MSc., Grupo de Diagnóstico y Manejo de Fitopatógenos,
Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), Cuba,
martinez@inisav.cu

Monroy Dosta, María del Carmen,
PhD., Departamento El Hombre y su Ambiente, Lab.
Análisis Químico de Alimento Vivo, Universidad Autónoma
Metropolitana, México, monroydosta@hotmail.com

Muñoz Paredes, Juan Fernando,
IQ., MSc. Ingeniería Ambiental, Grupo de Investigación GIA,
Universidad Mariana, Colombia, jfmunoz@umariana.edu.co

Pabón, Miguel A.,
Ing. Agr., MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad
Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Colombia,
miguelpabon@gmail.com

Parra-Orobio, Brayan Alexis,
MSc., Ing. Sanitario, Escuela de Ingeniería de Recursos
Naturales y del Ambiente-EIDENAR, Universidad del Valle,
Colombia,brayan.parra@correounivalle.edu.co

Patricio E. Paz, PhD., Profesor Asociado, Acuicultura,
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria,
Universidad en Tegucigalpa, Honduras, ppaz@zamorano.edu

Pengcheng, Wei,
PhD, Institute of Agricultural Engineering, Anhui Academy
of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China,
weipengcheng@gmail.com

Peraza, Andrés,
Ing. Agr., MSc, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional
de Colombia, Colombia, andresp8503@gmail.com

Pérez Bernal, Maylin,
MSc., CIGB Sancti Spiritus, Cuba, maylin.perez@cigb.edu.cu

Pérez Mancilla, Ximena C.,
cPhD., MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional
de Colombia, Colombia, xcperez@unal.edu.co

Pérez Vidal, Andrea,
Ingeniera sanitaria, PhD, Universidad del Valle, Colombia,
andreperezvidal@hotmail.com

Pinzón Gutiérrez, Yeimy Alexandra,
MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional
de Colombia, Colombia, yeialep@gmail.com

Pratta, Guillermo Raúl,
PhD., Facultad de Ciencias Agrarias, Cátedra de Genética-
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas,
Universidad Nacional de Rosario, Argentina, gpratta@unr.edu.ar

Reguero Reza, María Teresa,
MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional
de Colombia, Colombia, mtreguero@unal.edu.co

Rivera Escobar, Hernán Mauricio,
MSc., PhD., Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá,
Colombia, hmriverae@unal.edu.co

Roco Arriagada, Ángela,
PhD., Laboratorio de Carcinogénesis Química y
Farmacogenética, Centro de Investigaciones Farmacológicas
y Toxicológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile,
Chile, aroco@ift.cl

Rodríguez Victoria, Jenny Alexandra,
MSc., Universidad del Valle, Colombia,
jenny.rodriguez@correounivalle.edu.co

Rodríguez-Campos, Edmundo,
PhD., Departamento de Ciencias Básicas, Universidad
Autónoma Agraria Antonio Narro, México,
edmundor.dz@uaan.mx

Ron E., Ernesto J.,
PhD., MSc., Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Universidad
de Oriente (UDO), Venezuela, ernesto.ron@ne.udo.edu.ve

Rosas García, Ninfa María,
MSc., PhD Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Centro
de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional,
México, rrosas@ipn.mx

Ruiz Avila, Camilo A.,
Ing. Agr., MSc., Universidad Nacional de Colombia,
Sede Bogotá, Colombia, caaruizav@unal.edu.co

Seijas-Velásquez, Segundo,
PhD., Departamento de Ingeniería Industrial, Facultad de
Ingeniería, Universidad Nacional de Trujillo, Perú,
mabesei@yahoo.com

Sobral, Luis,
PhD., Metallurgical and Biotechnological Processes Urban
Mining Team "Turning Trash into Cash", Centre for Mineral
Technology CETEM/MCT, Brasil,
lsobral@cetem.gov.br,sobralui@gmail.com

Torres García, Ignacio,
PhD., Escuela Nacional de Estudios Superiores, Universidad
Nacional Autónoma de México, México,
itorres@cicco.unam.mx

Torres Lozada, Patricia,
Ing. Sanitaria, PhD., Vicedecana de Investigaciones y
Posgrados, Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle,
Colombia, patricia.torres@correounivalle.edu.co

Vega-Chaparro, Sandra,
PhD., Bioquímica e Inmunología, Universidad Nacional de
Colombia, Sede Bogotá, Colombia, sacvegach@unal.edu.co

Verastegui M., Anibal,
PhD., MSc., Facultad de Pesquería, Universidad Nacional
Agraria La Molina, Perú, anibal.verastegui@gmail.com

Villanueva Fierro, Ignacio,
PhD., MSc., Instituto Politécnico Nacional, México,
ifierro62@yahoo.com

Autores – Authors

A

Abalos Rodríguez, Arelis; Ph.D.,
Profesora Titular. Centro de Estudios de
Biotecnología Industrial, Universidad de
Oriente. Patricio Lumumba s/n Santiago de
Cuba. CP: 90500; Cuba; aabalos@uo.edu.cu

Abreu Remedios, Daymí; MSc
Plant Biology, Research Department. Center
for Genetic Engineering and Biotechnology of
Sancti Spiritus. P.O.Box 83, P.C. 60200. Sancti
Spiritus; Cuba; daymi.abreu@cigb.edu.cu

Acosta, Orlando;
Departamento de Ciencias Fisiológicas,
Facultad de Medicina, Universidad Nacional
de Colombia, Sede Bogotá; Colombia;

Ancízar Aristizábal, Fabio; Ph.D.,
Director Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional de Colombia, Sede
Bogotá; Colombia; faaristizabal@unal.edu.co

Angulo, Ada; Investigadoras M.Sc.
Fundación PROINPA, Casilla 4285,
Cochabamba; Bolivia;

Ariza Márquez, Yeimy Viviana; cPhD
Biotecnología. Universidad Nacional de
Colombia, Sede Bogotá; Colombia;
yvarizam@unal.edu.co

Armas Ramos, Raúl; MSc
Plant Biology, Research Department. Center
for Genetic Engineering and Biotechnology of
Sancti Spiritus. P.O.Box 83, P.C. 60200. Sancti
Spiritus; Cuba; raul.armas@cigb.edu.cu

B

Briceño Balcázar, Ignacio; Ph.D.,
Profesor titular, Universidad de la Sabana y
Pontificia Universidad Javeriana; Colombia;
ignaciobb@unisabana.edu.co

Buitrago Hurtado, Gustavo;
Grupo de Investigación sobre el cultivo de
Ñame, Instituto de Biotecnología, Universidad
Nacional de Colombia, Sede Bogotá;
Colombia; gbuitragoh@unal.edu.co

Bustamante Rodríguez, Silvia Lizette;
Grupo de Investigación sobre el cultivo de
Ñame, Instituto de Biotecnología, Universidad
Nacional de Colombia, Sede Bogotá;
Colombia; slbustamanter@unal.edu.co

C

Caicedo Pineda, Gerardo Andrés; PhD
Ingeniería – Ciencia y Tecnología de
los Materiales, Universidad Nacional de
Colombia Sede Medellín, Calle 10A # 43D-96;
Colombia; gacaiced@unal.edu.co

Cardona Juárez, Teresita; M. at C. (CIITEC-
IPN); México; sanfer_73@yahoo.com.mx

Carrillo-González, Fátima Maciel;
Centro de Estudios Meteorológicos de la

Costa CEMCO, Centro Universitario de la
Costa, Universidad de Guadalajara; México

Chaparro-Giraldo, Alejandro; Ingeniero
Agrónomo, MSc., Ph.D.
Grupo de Ingeniería Genética de Plantas.
Departamento de Biología & Instituto de
Genética. Universidad Nacional de Colombia,
Sede Bogotá; Colombia;
achaparro@unal.edu.co

Chávez-Parga, María del Carmen;
Facultad de Ingeniería Química,
Universidad Michoacana de San Nicolás
de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Francisco
J. Mújica S/N, Col. Felicitas del Río, 58030,
Morelia, Michoacán; México;
cparga@umich.mx

Cornejo-López, Víctor Manuel;
Centro Universitario de la Costa,
Unidad de Meteorología; México;
vicmancor@hotmail.com

Crombet Grillet, Sandra; MSc.,
Profesora Asistente. Departamento de
Química, Facultad de Ciencias Naturales
de la Universidad de Oriente. Patricio
Lumumba s/n Santiago de Cuba. CP: 90500;
Cuba; sscrombet@uo.edu.cu

Cubillos Hinojosa, Juan Guillermo;
Microbiólogo, MSc.
Ciencias Agrarias, Profesor Departamento de
Microbiología, Universidad Popular del Cesar;
Colombia; jcubillosh@gmail.com

D

Damián-Reyna, Andrés Alejandro;
Facultad de Ingeniería Química,
Universidad Michoacana de San Nicolás de
Hidalgo, Ciudad Universitaria, Francisco J.
Mújica S/N, Col. Felicitas del Río, 58030,
Morelia, Michoacán; México;
pandamian77@hotmail.com

David Hinestroza, Hilda Adriana; MSc.
Nutrición de Rumiantes. Centro de
investigación Turipán. Corporación
Colombiana de Investigación Agropecuaria
(Corpoica). km 13 vía Montería -Cereté;
Colombia; adavid@corpoica.org.co

Delgado Rigo, Magalis;
Laboratory Technician, Research Department.
Center for Genetic Engineering and
Biotechnology of Sancti Spiritus. P.O.Box 83,
P.C. 60200. Sancti Spiritus; Cuba;
magalis.delgado@cigb.edu.cu

Diazgranados, Cristina; Bióloga, MSc.
Grupo de Ingeniería Genética de Plantas.
Departamento de Biología & Instituto
de Genética. Universidad Nacional de
Colombia, Sede Bogotá; Colombia;
cristinadiazgranados@hotmail.com

Farfán-Molina, Luis Manuel;
Centro de Investigación Científica

y de Educación Superior de Ensenada,
Baja California, CICESE, Unidad La Paz,
Unidad de Meteorología; México;
farfan@cicese.com.mx

G

Gabriel, Julio; Investigador PhD.
Fundación PROINPA, Casilla 4285,
Cochabamba; Bolivia;
j.gabriel@proinpa.org

García Peréz, Diana Patricia;
Profesional en Acuicultura. Grupo
de investigación de Biotecnología
(GRUBIODEQ). Programa de Acuicultura.
Universidad de Córdoba; Colombia;
dianagracia2709@hotmail.com

García Ruíz, Daniela;
Ingeniera Biológica. Laboratorio de
Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia, Sede
Medellín; Colombia;
dagarcia.ruiz@unal.edu.co

Giraldo Marroquín, Natalia;
Grupo de Investigación sobre el cultivo de
Ñame, Instituto de Biotecnología, Universidad
Nacional de Colombia, Sede Bogotá;
Colombia; natu.giraldo@gmail.com

Gómez Gómez, Liliana; Bacterióloga,
Profesor Facultad de Ciencias Básicas y de
Educación, Universidad Popular del Cesar;
Colombia; lgomez@unicesar.edu.co

González-Hernández, Juan Carlos;
Laboratorio de Bioquímica del Departamento
de Ing. Bioquímica del Instituto Tecnológico
de Morelia, Av. Tecnológico # 1500, Colonia
Lomas de Santiaguito, 58120, Morelia,
Michoacán; México; jcgh1974@yahoo.com

Guerrero, Carlos A.;
Departamento de Ciencias Fisiológicas,
Facultad de Medicina, Universidad Nacional
de Colombia, Sede Bogotá; Colombia;
caguerrero@unal.edu.co

Gutiérrez Sánchez, Pablo; Biólogo, PhD,
Profesor Asociado. Laboratorio de
Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia, Sede
Medellín; Colombia; paguties@unal.edu.co

H

Hincapié Rojas, Viviana;
Licenciada en Biología, MSc. Grupo de
Ingeniería Genética de Plantas. Departamento
de Biología & Instituto de Genética.
Universidad Nacional de Colombia, Sede
Bogotá; Colombia;

L

Lara Mantilla, Cecilia; Ph.D.,
Grupo de investigación de Biotecnología
(GRUBIODEQ). Departamento de Química.

Universidad de Córdoba. Córdoba; Colombia;
lara_mantilla_cecilia@hotmail.com

M

Marín Montoya, Mauricio;
Ingeniero Agrónomo, MSc., PhD, Profesor Asociado. Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín; Colombia; mamarinn@unal.edu.co

Márquez Godoy, Marco; PhD.
Mineralogía, Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín, Carrera 80 # 65-223; Colombia; mmarquez@unal.edu.co

Márquez Godoy, Marco Antonio; PhD
Mineralogía, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Carrera 80 No. 65-223 - Núcleo Robledo; Colombia; mmarquez@unal.edu.co

Morales-Hernández, Julio Cesar;
Centro de Estudios Meteorológicos de la Costa CEMCO, Centro Universitario de la Costa, Universidad de Guadalajara; México; cesarbemarena@gmail.com

Moreno Sarmiento, Nubia; MSc.,
Profesor titular, Instituto de Biotecnología, Grupo de Bioprocesos y Bioprospección, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá; Colombia; ncmorenos@unal.edu.co

Moreno, Luz Y.;
Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá; Colombia;

O

Olarte Quintero, Manuel Andres;
Estudiante de Zootecnia. Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín; Colombia; maolarteq@unal.edu.co

Ortega Arroyo, Leslie; PhD.
(ESIME-IPN) Azcapotzalco; México; lortegaa@ipn.mx

P

Pariente, Leslie; Investigadoras.
Facultad de Bioquímica, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba; Bolivia;

Peón Escalante, Ignacio Enrique; PhD.
(ESIME-IPN) Zacatenco; México; ignaciopeon@gmail.com

Peralta Castilla, Arnaldo; Estadístico, MSc.
Educación, Profesor Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Popular del Cesar; Colombia; arnaldoperalta@unicesar.edu.co

Pérez Bernal, Maylin; MSc
Plant Biology, Research Department. Center for Genetic Engineering and Biotechnology of Sancti Spiritus. P.O.Box 83, P.C. 60200. Sancti Spiritus; Cuba; maylin.perez@cigb.edu.cu

Pérez Hernández, Elia;
División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Avenida Francisco J. Mújica S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 58030, Morelia, Michoacán; México; ely_ph@hotmail.com

Pérez Pazos, Jazmín Vanessa; MSc.
Ciencias Biológicas. Centro de investigación Turipaná. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica); Colombia; dbsanchez@corpoica.org.co

Pérez Pompa, Norma; MSc.,
Profesora Auxiliar. Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente. Patricio Lumumba s/n Santiago de Cuba. CP: 90500; Cuba; norma@uo.edu.cu

Pertúz Buelvas, Vicente Manuel; MSc.
Centro de Investigación Piscícola (CINPIC). Programa de Acuicultura. Universidad de Córdoba; Colombia; vipertuz@hotmail.com

Pinto, Linett; Investigadoras.
Facultad de Bioquímica, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba; Bolivia;

Pinzón Gutiérrez, Yeimy Alexandra;
Grupo de Investigación sobre el cultivo de Ñame, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá; Colombia; yeialep@gmail.com

Prada Fonseca, Maria; MSc.
Ingeniería de Materiales y Procesos, Universidad Nacional de Colombia –Sede Medellín, Calle 51 # 78 A - 73; Colombia; mcprada@unal.edu.co

R

Rivera Gonzalez, Massiel Vanesa;
Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental, Universidad Popular del Cesar; Colombia; massielvrg@hotmail.com

Rodríguez Pérez, Suyén; Ph.D,
Profesora Titular. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente. Patricio Lumumba s/n Santiago de Cuba. CP: 90500; Cuba; suyen@cebi.uo.edu.cu

S

Sánchez Góngora, María Antonieta; PhD.
Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica del Instituto Politécnico Nacional (ESIME-IPN) Zacatenco IPN Edif. 5, 3° Piso Av. Luis Enrique Erro s/n Zacatenco, Gustavo A. Madero 07738, México, Distrito Federal; México; mariaantonieta_gongora@yahoo.com.mx

Sánchez Lopera, Diana Beatriz; BSc Bióloga.
Centro de investigación Turipaná. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica); Colombia; jvperez@corpoica.org.co

U

Urriolagoitia Calderón, Guillermo; PhD.
(ESIME-IPN) Zacatenco; México; urrio332@hotmail.com

V

Valdivia Pérez, Onel; MSc
Plant Biology, Research Department. Center for Genetic Engineering and Biotechnology of Sancti Spiritus. P.O.Box 83, P.C. 60200. Sancti Spiritus; Cuba; onel.valdivia@cigb.edu.cu

Vellojín Furnieles, Jurleys Paola; Profesional en Acuicultura. Grupo de investigación de Biotecnología (GRUBIODEQ). Programa de Acuicultura. Universidad de Córdoba. Córdoba; Colombia; jurleyvellojin14@hotmail.com

Veramendi, Silene; Investigadoras M.Sc.
Fundación PROINPA, Casilla 4285, Cochabamba; Bolivia

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

La *Revista Colombiana de Biotecnología* publica únicamente artículos originales, principalmente contribuciones provenientes de investigación y desarrollo en las diversas áreas de la biotecnología, así como artículos técnicos que no presentan prueba de hipótesis, como la descripción técnica de métodos. También serán aceptadas notas breves; por ejemplo informes de un trabajo significativo cuyos objetivos sean de corto alcance.

Los autores deberán seguir las instrucciones que se presentan a continuación. Los artículos que no cumplan con éstas se devolverán sin ser evaluados. Los manuscritos deben enviarse por triplicado, en papel blanco de tamaño carta (21,6 x 27,5 cm), a espacio sencillo, con márgenes de 3 cm. Las dos copias deberán omitir la información de los autores. Debe incluirse la versión electrónica del trabajo en disquete o CD. Para agilizar el proceso de evaluación puede enviarse también una copia al correo electrónico que se indica al final. Los artículos deben ser elaborados utilizando Word Windows o aplicaciones compatibles, en letra Times new roman de 12 puntos.

El trabajo debe tener una extensión máxima de 20 páginas, incluidas figuras, tablas y bibliografía. El lenguaje utilizado debe ser claro y preciso. El trabajo debe estar escrito en estilo impersonal.

Los nombres comerciales y marcas deben evitarse en el texto, o referidos entre paréntesis. Los productos comerciales deben ser mencionados por el nombre técnico o el principio activo. Los nombres registrados deben ir acompañados por ®. Se deben utilizar las abreviaturas aceptadas internacionalmente. En caso de ser utilizadas siglas poco comunes, deberán indicarse completas la primera vez que se citan, seguida de la sigla entre paréntesis. Todas las abreviaturas y siglas deben escribirse sin punto. Use el sistema métrico decimal para todas las medidas y abreviaturas para las unidades comunes de medida: kilogramo (kg), gramo (g), miligramo (mg), metro (m), etc. Evite las notas de pie de página, excepto para la información de los autores del artículo. Utilice un solo tamaño de letra.

La estructura del artículo debe tener en cuenta los pasos del método científico, así:

Título. Debe ser corto pero ilustrativo, sin exceder de 15 palabras. Debe incluirse una traducción del título en inglés y un título corto para los encabezados de página.

Autores. En el crédito a los autores se deben incluir los nombres completos. Los autores deben ir en orden de acuerdo con la importancia de contribución a la investigación o en la preparación del artículo y no en orden alfabético ni de rango. En nota a pie de página y con asteriscos se indicarán respectivamente los títulos académicos, la institución a la cual pertenecen y la dirección postal completa (incluido e-mail).

Resumen. Debe ser conciso y contener información sobre justificación, objetivos, metodología y resultados concretos de la investigación. Debe indicar las principales conclusiones haciendo énfasis en los logros alcanzados. No debe exceder de 250 palabras escritas en un solo párrafo.

Palabras clave. Se debe elaborar una lista de cinco palabras del artículo, como máximo, diferentes de las incluidas en el título, que faciliten el uso de los sistemas modernos de catalogación y búsqueda de la información por computador.

Abstract. Debe ser una traducción técnica del resumen al idioma inglés.

Key words. Debe ser una traducción fiel de las palabras clave al idioma inglés.

Introducción: Debe describir el planteamiento general de un tema, dando la información necesaria en forma precisa y haciendo referencia sólo a la bibliografía directamente relacionada y considerada indispensable para el desarrollo del tema, que permita conocer el estado actual del mismo. Debe indicar con claridad el objetivo de la hipótesis de la investigación y su relación con otros trabajos relevantes. (No revisiones amplias de bibliografía).

Materiales y métodos: Deben describirse las técnicas y los equipos utilizados dentro de una secuencia que muestre de manera concreta y lógica el desarrollo de la investigación, con el fin de que puedan ser reproducibles. Las fuentes y el estado de pureza de los materiales y la descripción detallada de equipos sólo debe incluirse cuando éstos sean muy específicos o novedosos. Los procedimientos descritos por otros autores deben evitarse, pero si han sido modificados, se deben incluir los detalles de la modificación.

Resultados y discusión (la discusión puede ir como capítulo aparte). Los resultados experimentales podrán presentarse en tablas y figuras sólo cuando éstas sean absolutamente necesarias, y deben estar explicadas en forma sucinta pero completa en el texto. En caso de que los resultados estén sustentados por cálculos estadísticos, deberá mencionarse la procedencia de los datos y el método estadístico empleado. Las tablas se deben presentar con título e identificadas con números arábigos continuos. Las figuras, fotografías, dibujos, gráficos y mapas deben presentarse con título e identificarse con números arábigos. Se aceptan figuras elaboradas en computador cuando éstas sean impresas con características de alta calidad, preferentemente en impresora láser. Las fotografías se aceptan en blanco y negro. En caso de ser necesario incluir fotografías en color, el autor paga los costos de su impresión. La discusión debe ser breve y limitarse a los aspectos significativos del trabajo.

Conclusiones. Deben basarse en los resultados obtenidos; si es posible, deben ofrecer una solución al problema planteado en la introducción.

Agradecimientos. En caso de ser necesario manifestar agradecimientos a las personas o instituciones que contribuyeron de manera significativa a la realización del trabajo, éstos deberán ser muy cortos y concretos.

Cita bibliográfica. Solamente se aceptan referencias publicadas, citando el apellido del autor seguido del año de publicación entre paréntesis. Ejemplo: Rodríguez (1997). Cuando los autores sean tres o más se debe usar la expresión latina *et al.* Ejemplo: López *et al.* (1996). Si la cita se coloca al final se usa autor y fecha entre paréntesis: (Rodríguez 1997; López *et al.*, 1996).

Bibliografía. Se debe presentar en orden alfabético. Su presentación será de la siguiente manera.

Artículo. Autores, año, título del artículo, revista, volumen, número, páginas. Ejemplo: Pérez R., Lalucat J. 1980. Genes asesinos de vida libre. *Investigación y ciencia*. 44 (4): 38-45.

Libro. Autor, año de publicación, título, lugar de impresión, editorial o entidad responsable de la publicación, páginas. Ejemplo: Gómez, A; Posada, H. 1987. *Descripción de malezas en plantaciones de café*. Chinchiná, Colombia: Cenicafé, p. 481. Las tesis deben referenciarse como libro. Si algún trabajo tiene características propias y no puede cumplir todas las especificaciones señaladas anteriormente, se recomienda que por lo menos tenga en cuenta título, autor, resumen, palabras clave, traducciones del resumen y palabras clave, citas bibliográficas, conclusiones.

Artículos de revisión de tema

Los artículos de revisión solamente se aceptarán para publicación cuando sean solicitados por el Consejo Editorial. No obstante, los autores pueden proponer temáticas indicando el objetivo de la revisión, fuentes y métodos de búsqueda de referencias. El Consejo Editorial evaluará las propuestas y determinará si es posible su desarrollo e inclusión en la revista.

Los artículos de revisión, que de acuerdo con Colciencias, son documentos resultado de una investigación donde se analizan, sistematizan e integran los resultados de investigaciones publicadas o no publicadas sobre un campo en ciencia o tecnología, con el fin de dar cuenta de los avances y las tendencias de desarrollo, deben cumplir con las siguientes características:

Extensión entre 12 y 20 páginas. Componentes: resumen que enfatice en el significado de los hallazgos recientes, introducción, análisis crítico (presentar con subtítulos o secciones), conclusiones y bibliografía que abarque por lo menos 50 referencias, en su mayoría recientes (de los últimos cinco años en el caso de temáticas ampliamente conocidas). Además, se sugiere incluir tablas, esquemas y

figuras que dinamicen el texto y faciliten su comprensión. La revisión debe integrar adecuadamente la información recopilada y explicar con detalle las limitaciones e incongruencias de los resultados de los estudios publicados.

La *Revista Colombiana de Biotecnología* es una publicación arbitrada. Los artículos recibidos son enviados (sin nombres de autores) a pares evaluadores anónimos seleccionados por el Consejo Editorial. Sus observaciones son remitidas a los autores para que realicen las modificaciones correspondientes. El Consejo Editorial toma la decisión final sobre la publicación de los artículos.

Dirección

Revista Colombiana de Biotecnología
Consejo Editorial
Universidad Nacional de Colombia
Instituto de Biotecnología
Teléfonos: (571) 316 5450
316 5000 Ext. 16981 –
Fax: 3165415
A.A. 14490 de Bogotá
e-mail: revcbib_bog@unal.edu.co
www.rcb.unal.edu.co

Ética

Declaración de ética y buenas prácticas

El comité editorial de la Revista Colombiana de Biotecnología está comprometido con altos estándares de ética y buenas prácticas en la difusión y transferencia del conocimiento, para garantizar el rigor y la calidad científica. Es por ello que ha adoptado como referencia el Código de Conducta que, para editores de revistas científicas, ha establecido el Comité de Ética de Publicaciones (COPE: Committee on Publication Ethics) dentro de los cuales se destaca:

Obligaciones y responsabilidades generales del equipo editorial

- Relaciones con los lectores
- Relaciones con los autores
- Relaciones con los evaluadores
- Proceso de evaluación por pares
- Reclamaciones
- Fomento de la integridad académica
- Protección de datos individuales
- Seguimiento de malas prácticas
- Integridad y rigor académico

Más información:

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/about/editorialPolicies#custom-0>

AUTHOR INSTRUCTIONS FOR THE REVISTA COLOMBIANA DE BIOTECNOLOGÍA

The *Revista Colombiana de Biotecnología* only publishes original articles, mainly contributions from research and development (R&D) in biotechnology's diverse areas, as well as technical articles not necessarily orientated towards proving hypotheses (i.e. technical descriptions of methods). Brief notes will also be accepted, such as reports concerning significant work having short-term objectives.

Authors must follow the following instructions; articles not complying with them will be returned without being evaluated. Manuscripts must be submitted in triplicate, on letter-sized (21.6 x 27.5 cm), white paper; they must be single-spaced, with 3 cm margins. Two copies must omit author details. An electronic copy of the work must also be submitted on diskette or CD. A copy can also be sent to the e-mail address given at the end of these instructions to speed-up the evaluation process. The articles must be processed using Word for Windows or a compatible application, written in Times New Roman, font-size 12.

The work must not exceed a maximum of 20 pages, including Figures, Tables and Bibliography. The language used must be clear and precise and the work must be written in the third person. The past tense must be used for the Introduction, Materials and Methods and Results sections.

Commercial names and brand-names must be avoided in the body of the text (or referred to in parenthesis). Commercial products must be referred to by the technical name or the main ingredient (initial letter capitalised). Only internationally accepted abbreviations must be used. In the case of little-known acronyms being used, they must be written in full the first time that they are used, followed by the acronym in parenthesis. All acronyms and abbreviations must be written without a full-stop following them. The metric decimal system must be used for all measurements and those abbreviations for common units of measurement: kilogram (kg), gram (g), milligram (mg), meter (m), etc. Avoid footnotes, except for information regarding authors of an article. Use a single letter size.

The article's structure must follow the accepted steps used by Scientific Method, thus:

Title. It must be short but illustrative, without exceeding 15 words. This title must then be translated into Spanish and a short title for the pageheadings must also be included.

Authors. The complete names must be included when crediting the authors of any article. The authors must be listed in agreement with the importance of their contribution to the research or in the preparation of the article and not in alphabetical order, nor in terms of rank. Their respective academic distinctions, the institution to which they belong and their complete mailing address (including e-mail) must be marked by an asterisk and given in a footnote.

Abstract in English. This must be concise and contain information concerning the research's justification, objectives, methodology and concrete results. It must indicate the main conclusions, emphasising achievements. It must not exceed 250 words, these to be written in a single paragraph.

Key words in English. There must be a list containing a maximum of five key words from the article (different to those included in the title) facilitating the use of modern computerised cataloguing and information search systems.

Abstract in Spanish. This must be a technical translation of the abstract to the Spanish language.

Key words in Spanish. There must be a faithful translation of the key words to the Spanish language.

Introduction. This must describe the general purpose for writing on the subject, giving the necessary information precisely, referring only directly to that related literature considered indispensable for developing the subject, allowing the present state of the same to become known. It must clearly indicate the objective of the research's hypothesis and its relationship with other relevant work (it must not include extensive reviews of the bibliography).

Materials and Methods. The techniques and the equipment used must be described in a sequence specifically and logically showing the research's development so that they can be reproduced. The materials' sources, their state of purity and the detailed description of equipment must only be included when these are very specific or novel. Procedures described by other authors must be avoided; but, if they have been modified, then the details of such modification must be included.

Results and Discussion (the Discussion can be given as a separate section). Experimental results must only appear in Tables and Figures when these are absolutely necessary; they must be succinctly but completely explained in the text. When results are sustained by statistical calculation, the origin of the data and the statistical method used must be mentioned. The Tables must be given a title and be identified by continuous Arabic numbers. The Figures (photographs, drawings, graphs and maps) must appear with a title and be identified by Arabic numbers. Figures processed by computer (when these are printed with high quality characteristics, preferably by laser printer) are accepted. Black and white photographs are accepted. If it is necessary to include colour photographs then the author must pay the printing costs. The discussion must be brief and limited to the work's significant aspects.

Conclusions. They must be based on the results obtained. If it is possible, they must offer a solution to the problem outlined in the Introduction.

Acknowledgements. If it is necessary to show gratitude to people or institutions making a significant contribution towards the work, these must be kept short and concrete.

Bibliographical references in the body of the **Text**. Only published references can be accepted, mentioning the author's last name, followed by the year of publication in parenthesis, for example: Rodríguez (1997). When there are three or more authors, the Latin expression et al. must be used, for example: López et al. (1996). If the reference is made at the end of a phrase, author and date are given in parenthesis, for example: (Rodríguez 1997; López et al. 1996).

Bibliography. This must be presented in alphabetical order of first-named authors. Its presentation must be as follows.

For articles. Author(s), year, title of the article, journal, volume, number, page(s), i.e. Pérez, R.; Lalucat, J. 1980. Genes as assassins of free life. 44 (4): 38-45.

Books. Author (s), year of publication, title, place where printed, the publisher or organisation responsible for the publication, pages, i.e. Gómez A.; Posada, H. 1987. Chinchiná, Colombia: Cenicafé.p. 481.

A thesis must be referred to as if it were a book.

If any work has special characteristics and therefore cannot fulfil all those specifications previously indicated, then it is recommended that at least title, author(s), abstract, key words, translations of the abstract and key words, bibliographical appointments and conclusions should be given.

Articles dealing with topic review

Topic review articles will only be accepted for publication when requested by the Editorial Committee. Authors may however propose topics, indicating the purpose of such reviews and the reference sources and search methods to be used. The Editorial Committee will evaluate any such proposal and determine whether it should be developed and/or included in the journal.

According to Colciencias, review articles are documents resulting from research, analysing, systematising and integrating the results of published and unpublished research in a scientific or technological field so as to take account of advances and trends in R&D. They must fulfil the following characteristics.

Reviews must be between 12 and 20 pages long. Contents: they must have a Summary emphasising the significance of recent findings; an Introduction; a section for Critical Analysis (presented under subtitles or in sections); Conclusions; and a Bibliography, including at least 50 references, the majority being recent (i.e. published within the last five years in the case of wellknown topics). Schemes, Figures and Tables

should also be included, dynamising the text and facilitating understanding. A review should integrate the compiled information and give a detailed explanation of the limitations and any incongruence found in published studies' results.

The *Revista Colombiana de Biotecnología* is a peer-reviewed publication. Those articles received are sent (without authors' names) to anonymous peerevaluators selected by the Editorial Committee. Their observations are then sent to authors so that they can make the corresponding modifications. The Editorial Committee takes the final decision whether to publish a particular article.

Address

Revista Colombiana de Biotecnología
Consejo Editorial
Universidad Nacional de Colombia,
Instituto de Biotecnología
Telephones: (571) 316 5450
316 5000 Ext. 16981
Fax: 3165415
A.A. 14490 de Bogotá (P.O. Box)
e-mail: revcbib_bog@unal.edu.co
www.rcb.unal.edu.co

Ethics

Scope and policy

The editorial committee of the Colombian Journal of Biotechnology is committed to high standards of ethics and good practice in the dissemination and transfer of knowledge, to ensure scientific rigor and quality. That is why it has taken as reference the Code of Conduct for editors of scientific journals, has established the Ethics Committee Publications (COPE: Committee on Publication Ethics) within which it stands:

Statement of Ethics and Good Practice

- General duties and responsibilities of Editors
- Relations with readers
- Relations with authors
- Relations with reviewers
- The peer-review process
- Complaints
- Encouraging academic integrity
- Protecting individual data
- Ensuring the integrity of the academic record

More information:

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/about/editorialPolicies#custom-0>

REVISTA COLOMBIANA DE BIOTECNOLOGÍA

Volumen XVII, número 2, julio - diciembre de 2015

ISSN 0123-3475 (impreso) ~ E-ISSN 1909-8758 (en línea)

Título abreviado (en línea) rev.colomb.biotecnol.

www.rcb.unal.edu.co

© Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá,
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

La *Revista Colombiana de Biotecnología* inicia su periodicidad semestral en el primer semestre de 1997, siendo un medio especializado, interinstitucional e interdisciplinario, para la divulgación de desarrollos científicos y técnicos, innovaciones tecnológicas, avances en legislación, política y normatividad, tendencias de mercado, y en general, los diversos tópicos relativos a los sectores involucrados en la biotecnología, tanto en Colombia como en el exterior; así mismo, la revista se constituye en un mecanismo eficaz de comunicación entre los diferentes actores de la biotecnología.



Atribución: Atribución – No comercial – Compartir igual: Esta licencia permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de tu obra de modo no comercial, siempre y cuando le den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

Rector Universidad Nacional de Colombia

Ignacio Mantilla Prada

Vicerrector Universidad Nacional de Colombia

Diego Fernando Hernández Losada

Vicerrector de Investigación Universidad Nacional de Colombia

Dolly Montoya Castaño

Decano Facultad de Ciencias (e)

Jaime Aguirre Ceballos

Editor de la revista

Dolly Montoya Castaño, PhD

(Doctora en Ciencias de la Vida)

Universidad Nacional de Colombia, Bogotá

Contacto e información

Jaqueline Ramírez P.

Instituto de Biotecnología - Universidad Nacional de Colombia

Carrera 30 No. 45-03, Ed. Manuel Ancizar (224),

Código postal: 14490. Bogotá D. C., Colombia

Teléfono: (57-1) 316 5000, ext. 16981

Telefax: (57-1) 316 5415 e-mail: revcbib_bog@unal.edu.co

Canje

Dirección de Bibliotecas. Grupo de Colecciones

Hemeroteca Nacional Carlos Lleras Restrepo

Av. El Dorado No. 44A-40,

Bogotá, D. C., Colombia

Telefax: 316 5000, ext. 20082. a. a. 14490

Correo electrónico: canjednb_nal@unal.edu.co

Suscripciones:

Consignar la suma de \$30.000 equivalente a la suscripción anual (dos números) en la cuenta No. 209-849037-97 de Bancolombia a nombre de Corpodib-Revista Colombiana de Biotecnología.

Enviar al Fax (571) 316 5415 o por correo al Instituto Colombiano de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (AA. 14490 de Bogotá), copia de la consignación y sus datos completos (nombre, entidad, cargo, dirección para el envío, ciudad, país, teléfono, fax, e-mail).

