

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 carátula:**

"Separación de Recubrimiento nano estructurado"

**Explicación de la fotografía:**

**Descripción de la obra:** Recubrimiento delgado de bisulfuro de tungsteno que se ha separado parcialmente del sustrato.

**Técnica Utilizada:** Microscopía Electrónica de barrido. SEM

**Créditos de carátula:**

Foto ganadora Concurso de Fotografía en Micro y Nanociencias, realizado por el SENA.

**Autor:** Inés Carolina Ortega Portilla, Primer Premio.

**Lugar:** TPC- Cali - Universidad del Valle. Talento TPC Nodo Cali  
Correo: carolinaortega35@gmail.com

**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.snspp.mx/bidimasp/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.

**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.

## CONTENIDO

### EDITORIAL

La secuenciación del ADN: consideraciones históricas y técnicas María Teresa Reguero Reza.. . . . .	5
--	---

### ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Adsorción de Cr(VI) por <i>Cocos nucifera</i> L. en residuales de Fibrocemento en Santiago de Cuba Pérez Silva, Rosa María; Calzado Lamela, Orlindes; Cascaret Carmenaty, Dannis Adrián; Tur Naranjo, Enieyis .. . . .	9
Diseño asistido por computadora de la inmovilización covalente de bromelina y papaína Bessy Cutiño-Avila, Dayrom Gil Pradas, Carlos Aragón Abreu, Yuniel Fernández Marrero, Martha Hernández de la Torre, Emir Salas Sarduy, María de los Ángeles Chávez Planes, José Manuel Guisán Seijas, Joaquín Díaz Brito, Alberto del Monte-Martínez .. . . .	19
Micropropagación de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni, un endulzante natural a través de explantes con meristemos pre-existentes Isidro E. Suarez, Irma R. Quintero .. . . .	29
Purificación y caracterización de lipopolisacáridos de <i>Eikenella corrodens</i> 23834 y <i>Porphyromonas gingivalis</i> W83 Diego Fernando Gualtero Escobar, Jeimy Paola Porras Gaviria, Sebastián Bernau Gutiérrez, Diana Marcela Buitrago Ramírez, Diana Marcela Castillo Perdomo, Gloria Inés Lafaurie Villamil .. . . .	34
Evaluación <i>in vivo</i> del efecto cicatrizante de un gel a base de quitosano obtenido de exoesqueleto de camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> Heimy Franceline Martínez Sánchez, Amada Yerén Escobedo Lozano, Evaristo Méndez-Gómez, Alfredo Emmanuel Vázquez, Manuel de Jesús Sol Hernández, Anahí Elizabeth Osuna Lizárraga .. . . .	45
Estimulación de cardenóidos en brotes de <i>Digitalis purpurea</i> L. cultivados <i>in vitro</i> mediante elicitores Naivy Lisbet Pérez-Alonso, Franklyn Arana Labrada, Alina Capote Pérez, Anabel Pérez Pérez, Rafael Sosa, Angel Mollineda, Elio Jiménez González .. . . .	51
Caracterización morfológica y evaluación de resistencia a <i>Fusarium oxysporum</i> en especies silvestres del género <i>Solanum</i> sección <i>Lycopersicon</i> María Natalia Morales Palacio, Georgina Espinosa López, Ángel Rafael Morales Astudillo, Byron Rafael Sánchez Masache, Ángel Miguel Jiménez Castillo, Yoamel Milián-García.. . . .	62
Detección del virus del amarillamiento de las nervaduras de la hoja de la papa en diferentes órganos de <i>Solanum tuberosum</i> grupo <i>Phureja</i> cv Criolla Colombia utilizando RT-PCR convencional y en tiempo real Hernández-Guzmán Anngie Katherine, Guzmán- Barney M. Mónica.. . . .	74
Avances en la propagación vía embriogénesis somática de <i>Psychotria ipecacuanha</i> (Brot.) Stokes, planta medicinal en peligro crítico Esther J. Naranjo, Aura I. Urrea, Lucía Atehortúa .. . . .	86
Primera incursión en la obtención de curieles libre de patógenos específicos en Cuba Bárbara O González Navarro, Cándida Forte Miranda, Ramón Alonso Rojas†, Antonio Alfonso Montero, Liliana Francis Turner, María Elena Arteaga Pérez, Layna Riera Ojeda. . . . .	93
Nueva metodología para la formulación de la vacuna Heberpenta-L Imeray Díaz, Maikel Villegas, Luis Carlos Hidalgo. . . . .	99
Actividad antibacteriana de soluciones ácidas de quitosano obtenido de exoesqueleto de camarón Alexander Pérez Cordero, Johanna Rojas Sierra, Johana Rodríguez Ruiz Irma Arrieta Álvarez, Yenis Arrieta Álvarez, Andrés Rodríguez Carrascal . . . . .	104
Evaluación de la patogenicidad de <i>Xenorhabdus</i> spp. nativos en Colombia Beatriz Elena Guerra S., Julie Giovanna Chacón, Jaime Eduardo Muñoz F., Ana Milena Caicedo .. . . .	111
Estudio de libertad de operación para una línea genéticamente modificada de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) Viviana Patricia Hincapié Rojas, Alejandro Chaparro-Giraldo. . . . .	119
Influencia de la 6-Bencilaminopurina y el agente gelificante en la reducción de la hiperhidricidad en <i>Tectona grandis</i> L. Elisa Quiala, Marco V. Jiménez-Tello, Raúl Barbón, Maité Chávez, Manuel de Feria, Mariana La O, Marta Pérez.. . . .	129

Evaluación de la fermentación del lactosuero ácido (entero y desproteinizado) utilizando <i>Lactobacillus casei</i> Katia Cury Regino, Margarita Arteaga Márquez, Guillermo Martínez Flórez, Deivis Luján Rhenals, Alba Durango Villadiego .....	137
Crecimiento rápido autotrófico de microorganismos anaerobios oxidadores de amonio en presencia de nitrito, usando inóculos de Colombia Jaime Sánchez, Janeth Sanabria, Mike Jetten .....	146
Identificación, clonación y actividad lactonasa de la proteína recombinante de N-ácil homoserina lactonasa (AiiA) de <i>Bacillus thuringiensis</i> cepa 147-115-16 Álvaro M. Florez <sup>1</sup> , Adriana González, Carmen J. Pedroza, Elizabeth Correa, Nohora J. Rueda, Sergio Orduz .....	153
<b>ARTÍCULO CORTO</b>	
Producción de etanol a partir de yuca en condiciones de alta concentración de sólidos (VHG) Mabel Beatriz Esquivia Mercado, Hader Iván Castaño Peláez, Lucía Atehortúa Garcés, Alejandro Acosta Cárdenas, Carlos Eduardo Mejía Gómez .....	163
Optimización del medio de cultivo QBP para la producción de biomasa del consorcio BIOYAF Yaima Barrios San Martín, Silvia Acosta Días, Francisca González Hernández, Ranyer Hayes García .....	171
Consorcio microbiano nativo con actividad catalítica para remoción de índigo y surfactantes en agua residual industrial textil a través de una matriz de inmovilización Liliana Guerrero Porras, Elizabeth Serna, Santiago Cardona Gallo, Gloria Cadavid -Restrepo, Camilo Suárez, Luz Quintero-Rendón .....	177
<b>ARTÍCULO DE REVISIÓN</b>	
Rol biológico y aplicaciones de los miRNAs en cáncer de seno Yeimy Viviana Ariza Márquez, Ángela Patricia Beltrán López, Ignacio Briceño Balcázar, Fabio Ancízar Aristizábal .....	188
<b>BIONOTA</b>	
El dicloruro de mercurio como desinfectante en la micropropagación del comino ( <i>Aniba perutilis</i> Hemsley) Beltrán Pedroza Diana Marcela, Mesa López Neftalí .....	203
INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES .....	213

## CONTENTS

<b>EDITORIAL</b>	
DNA sequencing: historical and technical considerations María Teresa Reguero Reza .....	5
<b>RESEARCH ARTICLES</b>	
Cr(VI) adsorption by <i>Cocos nucifera</i> L. in wastewater of fibrocement from Santiago de Cuba Pérez Silva, Rosa María; Calzado Lamela, Orlindes; Cascaret Carmenaty, Dannis Adrián; Tur Naranjo, Enieyis .....	9
Computer-aided design of bromelain and papain covalent immobilization Bessy Cutiño-Avila, Dayrom Gil Pradas, Carlos Aragón Abreu, Yuniel Fernández Marrero, Martha Hernández de la Torre, Emir Salas Sarduy, María de los Ángeles Chávez Planes, José Manuel Guisán Seijas, Joaquín Díaz Brito, Alberto del Monte-Martínez .....	19
Micropropagation of <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni, a natural sweetener, through pre existing meristem explants Isidro E. Suarez, Irma R. Quintero .....	29
Purification and characterization of lipopolysaccharide from <i>Eikenella corrodens</i> 23834 and <i>Porphyromonas gingivalis</i> W83 Diego Fernando Gualtero Escobar, Jeimy Paola Porras Gaviria, Sebastián Bernau Gutiérrez, Diana Marcela Buitrago Ramírez, Diana Marcela Castillo Perdomo, Gloria Inés Lafaurie Villamil .....	34
Healing effect of a chitosan-based gel obtained from the exoskeleton of white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> and its evaluation <i>in vivo</i> Heimy Franceline Martínez Sánchez, Amada Yerén Escobedo Lozano, Evaristo Méndez-Gómez, Alfredo Emmanuel Vázquez, Manuel de Jesús Sol Hernández, Anahí Elizabeth Osuna Lizárraga .....	45
Stimulation of cardenolides production in <i>Digitalis purpurea</i> L. shoot cultures by elicitors addition Naivy Lisbet Pérez-Alonso, Franklyn Arana Labrada, Alina Capote Pérez, Anabel Pérez Pérez, Rafael Sosa, Angel Mollineda, Elio Jiménez González .....	51

Morphological characterization and resistance evaluation to <i>Fusarium oxysporum</i> in wild species <i>Solanum</i> genera <i>Lycopersicon</i> section María Natalia Morales Palacio, Georgina Espinosa López, Ángel Rafael Morales Astudillo, Byron Rafael Sánchez Masache, Ángel Miguel Jiménez Castillo, Yoamel Milián-García . . . . .	62
Potato yellow vein virus detection in different organs of <i>Solanum tuberosum</i> Phureja group cv Criolla Colombia by conventional and real time qRT-PCR Hernández-Guzmán Anngie Katherine, Guzmán- Barney M. Mónica. . . . .	74
Advances in vitro propagation via somatic embryogenesis of <i>Psychotria ipecacuanha</i> (Brot.) Stokes, medicinal plant critically endangered Esther J. Naranjo, Aura I. Urrea, Lucía Atehortúa . . . . .	86
First foray into the production of specific pathogen-free guinea pigs in Cuba Bárbara O González Navarro, Cándida Forte Miranda, Ramón Alonso Rojas†, Antonio Alfonso Montero, Liliana Francis Turner, María Elena Arteaga Pérez, Layna Riera Ojeda . . . . .	93
New methodology for the formulation of the vaccine Heberpenta-L Imeray Díaz, Maikel Villegas, Luis Carlos Hidalgo . . . . .	99
Antibacterial activity of chitosan acid solutions obtained from shrimp exoskeleton Alexander Pérez Cordero, Johanna Rojas Sierra, Johana Rodríguez Ruiz Irma Arrieta Álvarez, Yenís Arrieta Álvarez, Andrés Rodríguez Carrascal . . . . .	104
Evaluation of pathogenicity <i>Xenorhabdus</i> spp. natives in Colombia Beatriz Elena Guerra S., Julie Giovanna Chacón, Jaime Eduardo Muñoz F., Ana Milena Caicedo . . . . .	111
Study of freedom to operate for a genetically modified potato ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) line Viviana Patricia Hincapié Rojas, Alejandro Chaparro-Giraldo. . . . .	119
Influence of 6-Benzyladenine and gelling agent on the reduction of hyperhydricity in <i>Tectona grandis</i> L. Elisa Quiala, Marco V. Jiménez-Tello, Raúl Barbón, Maité Chávez, Manuel de Fera, Mariana La O, Marta Pérez. . . . .	129
Evaluation of acid whey fermentation (whole and deproteinized) using <i>Lactobacillus casei</i> Katia Cury Regino, Margarita Arteaga Márquez, Guillermo Martínez Flórez, Deivis Luján Rhensals, Alba Durango Villadiego . . . . .	137
Faster autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in presence of nitrite, using inocula from Colombia Jaime Sánchez, Janeth Sanabria, Mike Jetten . . . . .	146
Identification, cloning and lactonase activity of recombinant protein of <i>N</i> -acyl homoserine lactonase (AiiA) from <i>Bacillus thuringiensis</i> 147-115-16 strain Álvaro M. Florez, Adriana González, Carmen J. Pedroza, Elizabeth Correa, Nohora J. Rueda, Sergio Orduz . . . . .	153
<b>SHORT ARTICLES</b>	
Ethanol production from cassava using very high gravity conditions (VHG) Mabel Beatriz Esquivia Mercado, Hader Iván Castaño Peláez, Lucía Atehortúa Garcés, Alejandro Acosta Cárdenas, Carlos Eduardo Mejía Gómez . . . . .	163
Optimization of culture media QBP to the production of biomass of consortium BIOYAF Yaima Barrios San Martín, Silvia Acosta Días, Francisca González Hernández, Ranyer Hayes García . . . . .	171
Microbial consortium native catalytically active for removal of indigo and surfactants in textile industry wastewater through an immobilization matrix Liliana Guerrero Porras, Elizabeth Serna, Santiago Cardona Gallo, Gloria Cadavid-Restrepo, Camilo Suárez, Luz Quintero-Rendón . . . . .	177
<b>REVIEW ARTICLES</b>	
Biological role and applications of miRNAs in breast cancer Yeimy Viviana Ariza Márquez, Ángela Patricia Beltrán López, Ignacio Briceño Balcázar, Fabio Ancízar Aristizábal. . . . .	188
<b>BIONOTE</b>	
Dichloride of mercury as a disinfectant in the micropropagation of cumin ( <i>Aniba perutilis</i> Hemsley) Beltrán Pedroza Diana Marcela, Mesa López Neftalí . . . . .	203
AUTHOR INSTRUCTIONS FOR THE REVISTA COLOMBIANA DE BIOTECNOLOGÍA . . . . .	215



# La secuenciación del ADN: consideraciones históricas y técnicas

## DNA sequencing: historical and technical considerations

María Teresa Reguero Reza\*

Editorial

Es innegable la importancia que tiene la generación de conocimiento alrededor de una molécula como el DNA en proyectos de investigación, desarrollo e innovación en áreas tan relevantes como la agricultura, la salud o el medio ambiente. Pero este gran avance científico ha sido el resultado de la conjunción de una serie de trabajos, que se inician con la identificación del ADN como una molécula importante, en la que se centra la transmisión de los determinantes genéticos de la herencia.

En el jardín de un monasterio, Gregor Mendel realizó sus experimentos de hibridación con plantas de arvejas (*Pisum sativum*), encontrando que las nuevas características que presentaban las plantas, eran el resultado de la mezcla de los caracteres iniciales que poseían las plantas. Hace 149 años Mendel dictó una conferencia acerca de la importancia de un “factor” de la herencia y ello podría considerarse como el punto de partida para lograr la identificación, aislamiento y caracterización de estos atributos y la forma como podrían ser fijados en una especie. Se le reconoce a Mendel ser el iniciador de las leyes fundamentales de la herencia, que impulsaron el desarrollo de la biología moderna.

Por primera vez, en 1871, Johann Meisher hace una descripción del ácido desoxirribonucleico (ADN) en el espermatozoide de la trucha, y en 1944 tres investigadores: Oswald Avery, Colin McLeod y Maclyn McCarty, demuestran que el ADN es la molécula en donde se encuentra la información genética.

En la década de 1940, Frederick Sanger, investigador del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Cambridge, estaba interesado en el metabolismo de los aminoácidos y en la secuenciación de estos en una proteína de gran interés biológico: la insulina. En esa época no se conocía la estructura del ADN, por lo que su investigación se enfocaba en la elucidación estructural de las proteínas, compuestos que se creía conformaban el material genético.

La determinación de que las cantidades de adenina y timina y las de citosina y guanina son las mismas, es un gran aporte que hace Erwin Chargaff en 1950 y que, posteriormente, se constituyó en la “Regla de Chargaff”. Para complementar los aportes a la estructura del ADN, en 1952 Rosalind Franklin y Maurice Wilkins realizaron estudios de cristalografía de rayos X de esta molécula.

Como se ha mencionado, durante algún tiempo se consideró que el “factor” de la herencia de Mendel eran las proteínas. El 25 de abril de 1953, es un día importante para el conocimiento de la molécula que contiene la información genética que todo organismo. Este día se publica un artículo de tan solo dos páginas (737-738) en la revista *Nature* con el título de “Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid” cuyos autores eran J.D. Watson y F.H.C. Crick. Fundamentalmente, Watson y Crick proponen la estructura de doble hélice del ADN, sustentada en el apareamiento específico que presentan las cuatro bases que la conforman: A-T y C-G. Esta publicación se convertiría en la piedra angular de la investigación genómica y con ello abren una senda, por la que la investigación y el desarrollo tecnológico han transitado en los últimos sesenta años.

En 1958 le fue otorgado a Frederick Sanger su primer Premio Nobel de Química “por su trabajo en la estructura de proteínas, particularmente de la insulina”, pues su trabajo de investigación llegó a la conclusión principal de que las dos cadenas polipeptídicas de la insulina tenían secuencias de aminoácidos precisos y, por extensión, que cada proteína tenía una secuencia única. Con este reconocimiento se pone de manifiesto la importancia de la secuenciación en el estudio de la relación entre la estructura y la función de las moléculas biológicas.

Otro hito relevante para el futuro de la investigación genómica es el que realizaron, entre 1957 y 1958, Matthew Meselson y Franklin Stahl al demostrar que el ADN se replica a través de un proceso semi-conservativo.

\* Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. mtregueror@unal.edu.co

A principios de la década de 1970 Allan M. Maxam y Walter Gilbert adscritos al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Harvard, investigan sobre la secuenciación del ADN y en febrero de 1977 publican, en *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, un artículo que titularon “A New method for sequencing ADN” en el que afirman que el ADN puede ser secuenciado por un procedimiento químico, mediante el cual es posible determinar la secuencia de nucleótidos del ADN. La propuesta se resume en la realización de cuatro reacciones diferentes de síntesis de ADN utilizando un dideoxinucleótido (ddNTP) distinto en cada tubo y nucleótidos normales, lo que permite la síntesis de diversos fragmentos que terminan con un ddNTP específico y posteriormente son separados por electroforesis, de acuerdo con su tamaño. Utilizando esta metodología es posible secuenciar ADN en término de horas.

Frederick Sanger, tomando en consideración lo reportado por Meselson y Stahl, desarrolla un método de secuenciación de pequeños fragmentos de ADN cuyo enfoque diferencial, frente a la propuesta de Maxam y Gilbert que era eminentemente química y tomaba al menos un día, fue la utilización de síntesis enzimática de la cadena complementaria del fragmento de ADN a secuenciar. Utilizando esta estrategia, Sanger y colaboradores, en 1978, realizan la secuenciación total del bacteriófago  $\Phi$ -X174 y desde entonces es el método más utilizado para determinar secuencias de ADN. En 1980 Sanger y Gilbert fueron laureados con el Premio Nobel en Química, el segundo para Sanger, “por sus contribuciones en la determinación de la secuencia de las bases en los ácidos nucleicos”. Este mismo año le fue otorgado el Premio Nobel a Paul Naim Berg, profesor de la Escuela de Medicina de la Universidad de Washington y Profesor Emérito de la Universidad de Stanford, “por sus estudios sobre la bioquímica de los ácidos nucleicos en particular por la técnica del ADN-recombinante”. En 1981 se reporta la secuencia del ADN mitocondrial humano y Robert A. Weinberg (MIT), Michael Wigler (Cold Spring Harbor Laboratory) y Mariano Barbacid (NIH), líderes de tres grupos de investigación, informan por primera vez que los oncogenes son responsables de un cáncer humano.

En cuanto a los aspectos técnicos en los que se fundamenta la secuenciación, es relevante mencionar el gran aporte de Kary Mullis quien, en abril de 1990, publica un artículo en *Scientific American*, el que describe la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) que permite amplificar millones de veces fragmentos específicos de ADN.

Hasta este momento la secuenciación era un proceso manual, pero en 1982 Marvin Caruthers y Leroy Hood desarrollan el primer método automatizado para secuenciar ADN, el cual era capaz de secuenciar fragmentos de 5 a 75 pares de bases (pb) y, en 1986, Leroy Hood y Lloyd Smith diseñan el primer secuenciador automático que utiliza rayos láser que reconocen marcadores de fluorescencia en el ADN.

Analicemos lo acaecido en la evolución de los procesos de secuenciación del ADN, al pasar del método de Sanger, que era manual, al advenimiento de los secuenciadores automáticos diseñados por Leroy Hood y un grupo de investigadores del Instituto Tecnológico de California (CALTECH). Básicamente, la finalidad que perseguían era automatizar los procesos que se llevaban a cabo en el laboratorio y hacerlo en colaboración con el sector empresarial, para posteriormente comercializar sus innovaciones. En los proyectos de investigación del grupo de Hood en CALTECH se empleaba de manera rutinaria la secuenciación manual de proteínas y decidieron que la automatización sería una excelente oportunidad para comercializar el equipo. Con este propósito en mente buscaron financiación para el proyecto y crearon una empresa *start-up* que denominaron Applied Biosystems, la cual se encargaría de la comercialización de lo que desarrollarían. Dado que uno de los problemas para la automatización del equipo era la lectura de la secuencia, cuya interpretación la realizaba visualmente el investigador, idearon la inclusión de un computador y sustituyeron las bandas negras que se obtenían en las tiras, por bandas de un color diferente para cada uno de los nucleótidos detectados por láser, generando información digital que el computador era capaz de procesar.

Estas técnicas son básicas en la realización del Proyecto Genoma Humano (PGH). El primero de octubre de 1990 el Instituto Nacional de Salud (NIH) y el Departamento de Energía de los Estados Unidos (DOE), informan oficialmente el lanzamiento del Proyecto Genoma Humano (PGH) y nombran a James Watson director del Centro Nacional de Investigación del Genoma Humano. Se inicia la ejecución del proyecto en 1991 y al año siguiente nace “The Institute for Genomic Research” (TIGR). En 1994, se tiene el primer mapa genético y en 1996, el mapa físico (ESTs); se crea la corporación privada Celera Genomics (1998) y para 1999 se obtiene la secuencia completa del primer cromosoma: el número 22. Posteriormente, en el año 2000, se dispone del primer borrador y el lunes 26 de junio de ese año, el doctor J. Craig Venter anunciaba, en una conferencia de prensa en la Casa Blanca y con la presencia del presidente de los Estados Unidos, Bill Clinton, y el primer ministro de Gran Bretaña, Tony Blair, que era un día histórico para la humanidad al poder leer, por primera vez, las letras químicas del código genético humano. Así mismo resaltaba que este resultado era el esfuerzo conjunto de múltiples investigadores en una alianza de instituciones públicas y privadas, que había iniciado cinco años antes, The Institute for Genomic Research in Rockville, Maryland.

Cabe señalar que, concomitantemente con el desarrollo del proyecto del genoma humano, en 1990 tres grupos de investigación diseñaron en forma simultánea, el método de electroforesis capilar que sería de gran utilidad en la secuenciación. El primer genoma totalmente secuenciado de una célula procariota fue el de *Haemophilus influenzae* en 1995; un año después se reporta el genoma de una levadura: *Saccharomyces cerevisiae*. En 1998 se termina la secuenciación del geno-

ma de un animal *Caenorhabditis elegans* y en el siguiente año se realiza la secuenciación del primer cromosoma humano, el número 22. Al disponer de equipos de secuenciación automática cada año aparecen nuevos genomas, y es así como en el año 2000 se dispone del primer genoma de un vegetal: *Arabidopsis thaliana*. En 2003 se completó la secuenciación del genoma humano, que si se colocara en papel ocuparía alrededor de 100 volúmenes, cada uno con 1000 páginas escrito con los cuatro caracteres A, T, C y G. Por ello, para que la información obtenida, pudiese ser consultada en la red, hubo necesidad de desarrollar sistemas de cómputo capaces de almacenar y procesar los datos.

Merece la pena mencionar que el costo total del proyecto del genoma humano ascendió a US\$ 2700 millones, y en la actualidad el costo por genoma secuenciado oscila entre US\$ 5000 y US\$ 3000, lo que muestra la necesidad de contar con secuenciación de bajo costo y ello ha dado lugar a las distintas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento. Para lograr disminuir más los costos de la secuenciación de un genoma humano, dos empresas: Life Technology® e Illumina® se encuentran diseñando secuenciadores cuya finalidad es poder secuenciar por US\$ 1000 o menos, fundamentado en el avance de la nanotecnología y particularmente con la utilización de nanoporos para una sola molécula. Esta aplicación de los nanoporos fue descrita y patentada ante la Oficina de Patentes de los Estados Unidos, por George Church y colaboradores, cuya solicitud data de 1995 y que fue otorgada en 1998.

Es innegable el gran potencial que tiene el conocimiento de los factores genéticos, asociados a enfermedades o desordenes genéticos, para su detección y posible tratamiento. En este contexto la secuenciación de nueva generación (NGS – Next Generation Sequence) de genomas, es una tecnología ideal para ser utilizada, debido a su rapidez y economía pero adicionalmente porque permite obtener datos en forma rápida, confiable y de buena calidad para el entendimiento de sistemas biológicos a nivel de genoma, transcriptoma, metaboloma o epigenoma. La NGS de genomas implica la confluencia de equipos automatizados, en los que los avances experimentales en química, ingeniería, biología molecular, nanotecnología se entrelazan con la computación de alto rendimiento, para incrementar la velocidad con la cual se obtienen los datos, su almacenamiento, así como su análisis y procesamiento.

A partir de 2011 se dispuso de varias plataformas para realizar la secuenciación, un ejercicio de comparación del desempeño de tres plataformas de secuenciación de nueva generación: Ion Torrent®, Pacific Biosciences®, Illumina MiSeq® fue realizado por Michael A. Quail y colaboradores del Instituto Sanger (2012) para determinar la secuencia de cuatro genomas bacterianos en el que se evalúan parámetros tales como cantidad de muestra (3 mg - 50 ng); tiempo de procesamiento (30 min. - 11 días); pares de bases por corrida (52.5 kb - 600 Gb). En 2012 Illumina® lanzó una nueva versión de su secuenciador HiSeq® 2500, que es un sistema de nueva generación de secuenciadores, cuyas características principales son la rapidez, pues es capaz de secuenciar un genoma en tan solo 24 horas y el número de datos, ya que puede generar 120 gigabases de datos en 27 horas o 600 Gb por corrida.

Los datos de secuenciación obtenidos con esta tecnología disminuyen tiempo y costo y, al integrarlos con los datos biológicos, generan información genómica relevante para la clínica, ya que pueden ser utilizados para la predicción de sets de datos que se utilizan en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, para establecer su incidencia en una determinada patología o como blanco terapéutico. Esta estrategia innovadora permite su utilización en áreas como la agricultura, nutrición y salud. Particularmente, se pueden evidenciar biomarcadores y diseñar nuevas entidades moleculares en oncología o en la caracterización de enfermedades genéticas orientadas hacia la consolidación de la medicina personalizada o medicina de precisión, entendida como la habilidad de diseñar tratamientos terapéuticos acordes con las distintas características de cada paciente, incorporando la información genómica para hacer más asertiva la toma de decisiones.

Es también importante reflexionar sobre la necesidad de contar con talento humano experto, no solo en secuenciación, sino en bioinformática y en aspectos clínicos, para implantar y apoyar su inminente utilización en forma rutinaria, como parte de las determinaciones que ofrecerán los laboratorios clínicos y de las cuales ya se pueden mencionar algunos ejemplos: cáncer de seno, de pulmón, de hígado y colorrectal.

Para apoyar este tipo de aplicaciones de la secuenciación, el 4 marzo de 2014 se realizó en Londres una reunión de los integrantes de la Global Alliance for Genomics and Health, en la que también participaron entidades públicas y privadas de investigación biomédica, entre las que se pueden citar Wellcome Trust, los Institutos de Salud de los Estados Unidos, las universidades de Berkeley, Oxford, Stanford Texas, John Hopkins, la Sociedad Americana de Oncología Clínica y Genética Humana, el Centro Nacional de Análisis Genómico de España, industrias farmacéuticas como Sanofi y Merck y empresas de computación como IBM, de secuenciadores Illumina® y Google, entre otras. El propósito de esta magna reunión fue, como en el caso del PGH, aunar esfuerzos para recopilar la información sobre datos clínicos y genéticos con el propósito de avanzar hacia la medicina de precisión. Ese mismo día Craig Venter anunció la creación de la empresa Human Longevity Inc. (HLI®) y de un nuevo proyecto cuyo propósito es recopilar y analizar el genoma y los parámetros bioquímicos de miles de personas, que voluntariamente desean participar en el proyecto. Se espera poder

secuenciar 40 000 genomas al año, con la finalidad de desarrollar *kits* de diagnóstico, predecir el riesgo de padecer una determinada patología y comercializar los productos que este proyecto genere para el diseño de una terapia personalizada. Otra vertiente de la secuenciación masiva de genomas es la que abanderó California Life Company (Calico®), empresa cuyos desarrollos se orientan a mitigar y curar el envejecimiento y las enfermedades asociadas.

Finalmente y en honor a la molécula del ADN por su importancia para las ciencias de la vida, el día 25 de abril se ha designado como el “día del ADN” coincidiendo con el día que apareció la publicación de Watson y Crick y tomando en consideración que el conocimiento sobre el ADN ha sido factor clave para el desarrollo de la industria biotecnológica orientada a sectores como salud, agropecuario, ambiental y bioenergético, entre otros.

## Referencias bibliográficas

- Church G.M., Deamer D.W., Branton D., Baldarelli R., Kasianowicz J. 1998. Characterization of individual polymer molecules based on monomer-interface interaction. *US PATENT* 5.795.782. Solicitada el 17 de marzo de 1995; otorgada el 18 de agosto de 1998.
- De Necochea Campion R., Canul Tec J.C. 2004. *Métodos Físicoquímicos en Biotecnología: Secuenciación de Ácidos Nucleicos*. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología. Consultado en: [http://pt7mdv.ceingebi.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion\\_acidos\\_nucleicos.pdf](http://pt7mdv.ceingebi.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion_acidos_nucleicos.pdf)
- International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409: 860-921. doi:10.1038/35057062
- Maxam A.M., Gilbert W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74(2): 560-564.
- Mayr E. 1982. The growth of Biological Thought: Diversity, evolution, and inheritance. Harvard University Press. Pp. 681 - 726.
- Mullis K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 262(4): 56-61.
- Olson M. 1993. The human genome project. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90(10): 4338-4344.
- Quail M.A., Smith M., Coupland P., Otto T.D., Harris S.R., Connor T.R., Bertoni A., Swerdlow H.P., Gu Y. 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 13(1): 341-353. doi:10.1186/1471-2164-13-341.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74(12): 5463-5467.
- Schlenk F. 1988. Early nucleic acid chemistry. *Trends in Biochemical Sciences*. 13(2): 67-69.
- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., ... , & Zhu X. 2001. The sequence of the human genome. *Science*. 291(5507):1304-1351.
- Watson J.D., Crick F.H.C. 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 171: 737 - 738. doi:10.1038/171737a0

# Adsorción de Cr(VI) por *Cocos nucífera* L. en residuales de Fibrocemento en Santiago de Cuba

## Cr(VI) adsorption by *Cocos nucífera* L. in wastewater of fibrocement from Santiago de Cuba

Pérez Silva, Rosa María\*; Calzado Lamela, Orlindes\*\*; Cascaret Carmenaty, Dannis Adrián\*\*\*; Tur Naranjo, Enieyis\*\*\*\*

### Resumen

La adsorción y/o formación de complejos de metales pesados basados en la actividad química de la biomasa, es el proceso conocido como biosorción y es la base de una nueva tecnología para su remoción en efluentes industriales y su posterior recuperación. En esta tecnología se pueden utilizar diferentes tipos de biomasa tales como: algas, microorganismos y subproductos agrícolas. Este trabajo estudió la adsorción de Cr(VI) utilizando la cáscara del fruto de la planta *Cocos nucífera* L. como biomasa orgánica. Los valores óptimos de adsorción de Cr(VI) son: pH de 3 unidades; tamaño de partícula menor que 0,074 mm; dosis de adsorbente de 5 g.dm<sup>-3</sup> y tiempo de contacto de 1 hora. A valores bajos de concentración del metal (1,0; 1,5 y 1,84 mg.dm<sup>-3</sup>) se obtuvo porcentaje de remoción superiores a 90, sin embargo a altos valores de concentración (2,5 y 3 mg.dm<sup>-3</sup>), se obtienen valores inferiores al 90 %. El proceso pudo ser estudiado a través de los modelos de Langmuir y de Freundlich, ya que el coeficiente de correlación para ambos modelos fue de 0,994 y 0,991 respectivamente. Se logra remover los iones Cr(VI) a valores de pH de 3 y 7 unidades en una matriz real, alcanzando valores de remoción de 96,85 % y 93,71 % respectivamente.

**Palabras clave:** biosorción, Cr<sup>6+</sup>, biomasa vegetal, Langmuir, Freundlich.

### Abstract

Adsorption and/or formation of complexes of heavy metals based on the chemical activity of the biomass, it is the process known as biosorption and it is the base of a new technology for its removal in industrial effluent and its posterior recuperation. In this technology, different kinds of biomasses can be utilized such as: algae, microorganisms and agricultural subproducts. In this work, the adsorption of Cr(VI) was studied utilizing the nutshell of the fruit of the plant *Cocos nucífera* L. as organic biomass. The optimal values of adsorption of Cr(VI) are: pH of 3 units, size of particle smaller than 0.074 mm, doses of adsorbent of 5 g.dm<sup>-3</sup> and contact time of 1 hour. At low values of concentration of the metal (1.0, 1.5 and 1.84 mg.dm<sup>-3</sup>) percentage of removal superior to 90% were obtained, however, at high values of concentration (2.5 and 3 mg.dm<sup>-3</sup>) values inferior to 90 % are obtained. The process can be studied by the models of both, Langmuir and of Freundlich, because the coefficient of correlation for these two models was 0.994 and 0.991 respectively. The ions Cr(VI) can be removed at values of 3 and 7 units in a real matrix, reaching removal values of 96.85% and 93.71% respectively.

**Key words:** biosorption, Cr(VI), vegetal biomass, Langmuir, Freundlich.

**Recibido:** junio 15 de 2013

**Aprobado:** abril 1 de 2014

### Introducción

La pared celular de los tejidos vegetales, está compuesta por sustancias químicas muy complejas, polímeros

sustituidos con grupos funcionales expuestos hacia el exterior celular, ejemplo de esto son los grupos carboxilos, aminos, hidroxilos, fosfatos y sulfidrilos, los

\* Doctora en Ciencias Químicas. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Facultad de Ciencias Naturales (FCN), Universidad de Oriente (UO), Santiago de Cuba, Cuba. Tel.: 22632095, 22632263, e-mail: rmaria@cebi.uo.edu.cu.

\*\* Licenciada en Química. Departamento de Química, FCN, UO. Tel: 22632263, e-mail: lamelat@cnt.uo.edu.cu.

\*\*\* Máster en Biotecnología. Departamento de Química, FCN, UO. Tel: 22632263, e-mail: dncascaret@cnt.uo.edu.cu.

\*\*\*\* Licenciada en Biología. Departamento de Biología, FCN, UO. Tel: 22632263, e-mail: etur@cnt.uo.edu.cu.



cuales pueden retener elementos metálicos presentes en disolución a través de interacciones físico-químicas. Este fenómeno es conocido como adsorción y se caracteriza por ser un mecanismo de cinética rápida que no presenta una alta dependencia con la temperatura (Jong, T. and P.D. L., 2004).

Los subproductos agrícolas son fuente valiosa de materias primas que pueden ser aprovechados en la aplicación de nuevos procedimientos, que contribuyan a aportar soluciones a los problemas de contaminación ambiental, creados por el vertido de residuales líquidos en el medio ambiente.

La biomasa obtenida a partir de los desechos de las agroindustrias, involucran la generación de grandes volúmenes de sólidos de origen vegetal; en estado seco, se convierte en un adsorbente eficaz para la remoción de especies metálicas de los efluentes. La remoción de metales por este medio, desempeña un papel determinante en los ciclos de las especies orgánicas e inorgánicas que interactúan en el medio ambiente, siendo la base para nuevos procesos de tratamiento de efluentes contaminados (Lloyd *et al.*, 2003).

Los metales son especies químicas no degradables. Por tal motivo, una vez presentes en el medio ambiente, sólo pueden distribuirse entre los ecosistemas aire - agua - suelo, ya sea cambiando su estado de oxidación o incorporándose a los seres vivos. Los procesos de adsorción y la formación de complejos en medios naturales son responsables de la acumulación de la mayor parte de los vestigios de metales pesados en los sólidos en suspensión, incorporándose rápidamente a los sedimentos, donde se presentan los mayores niveles de concentración de estos contaminantes. Como resultado de estas interacciones, los sedimentos juegan un papel muy importante en la regulación de la calidad del agua (Buffle and Scott, 1987, Hursthouse 2001, Kalbitz and Wennric, 1998, Kim *et al.*, 2002).

La fábrica de fibrocemento de Santiago de Cuba, durante el proceso productivo, vierte considerable volumen de residuales líquidos con contenido de Cr(VI), producto de las materias primas que ingresan en el proceso tecnológico, los cuales se vierten al río Yarayó afectando el equilibrio ecológico e influyendo de forma negativa en el medio ambiente. Este fenómeno tiene gran impacto en la sociedad, ya que este tipo de contaminante es el causante de desarrollar diferentes enfermedades que afectan al ser humano. Los peces y los invertebrados marinos, son especialmente sensibles a la exposición y pueden transmitirse de forma directa a la cadena alimentaria, por esto un tratamiento sustentable de los residuales con este contaminante, constituye una tecnología, que básicamente permite la recuperación del medio en un período de tiempo a través de la aplicación de técnicas de adsorción, siendo el objetivo de este trabajo estudiar el proceso de adsorción de Cr(VI) utilizando la cáscara del fruto de la planta de *Cocos nucífera* L. para el tratamiento de

las aguas residuales generadas en la fábrica de fibrocemento de Santiago de Cuba.

## Materiales y métodos

**Adsorbente estudiado:** La adsorción de Cr(VI) se lleva a cabo empleando la cáscara seca del fruto de la planta *Cocos nucífera* L. obtenida de los alrededores de la Universidad de Oriente. Ésta es secada al sol previa a las operaciones de cortado, molienda y tamizado utilizando un vibrador con tamices de porosidad de 0,42; 0,297; 0,149; 0,125 y 0,074 mm., siendo utilizada las fracciones de menor diámetro. Posteriormente se lava con agua bidestilada para eliminar cualquier material soluble que se encuentre presente y pueda interferir en el proceso de adsorción y se seca en estufa a 105 °C.

**Muestreo, conservación y análisis de las de muestras:** Las muestras para el análisis (matrices reales) fueron tomadas antes y después del sistema de tratamiento (decantador) procedentes del taller 1 de la fábrica de fibrocemento de Santiago, en envases de plástico de 1,5 L de capacidad. La toma y conservación de las mismas, se realizó mediante la metodología establecida en el Standard Methods (APHA, 1998).

**Métodos analíticos:** Teniendo en cuenta que en el proceso de adsorción influyen los parámetros químicos-físicos: temperatura (T), pH, Conductividad Eléctrica ( $\lambda$ ) y concentración del metal de interés, se procede a la determinación de estos en las muestras tomadas, según el procedimiento establecido en el Standard methods (APHA, 1998).

El seguimiento a la variación de la concentración de Cr(VI) en el estudio de adsorción por el adsorbente (cáscara seca de *Cocos nucífera* L.), se realiza por el método espectrofotométrico de la difenilcarbazida reportado en el Standard methods, basado en una reacción de oxidación-reducción entre el cromo hexavalente y la 1,5- difenilcarbazida (Uni-chem) en medio ácido para dar cromo III y 1,5-difenilcarbazona de color rojo-violeta que se lee espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm.

Los datos fueron procesados por el programa estadístico Statgraphics plus, versión 5.1. Se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA-S), tomando como factor la variable: pH, tiempo, cantidad de biomasa y concentración y como variables dependientes: porcentaje de eficiencia de remoción (EBA) y capacidad de adsorción ( $Q_e$ ). Para detectar diferencias significativas entre las medias de las concentraciones determinadas luego de realizados los experimentos, se realizó un contraste hipótesis.

**Determinación de las condiciones más adecuadas para la adsorción de Cr(VI):** Los parámetros estudiados fueron a. Selección del pH para la adsorción del Cr(VI), b. Determinación de la influencia del tamaño de la partícula en el proceso, c. Evaluación de la in-

fluencia de la dosis de adsorbente, *d*. Determinación del tiempo para la adsorción de Cr(VI) y *e*. Evaluación de la influencia de la concentración inicial del metal, para la remoción de este en las muestras analizadas.

*a. - Selección del pH para la adsorción de Cr(VI):* Los experimentos de adsorción fueron realizados por triplicado en matraces enlarmeyers de 250 mL de capacidad, utilizando 5 g.dm<sup>-3</sup> de biomasa seca de 1 mm de tamaño de partícula y un nivel de concentración de Cr(VI) de 1,84 mg.dm<sup>-3</sup>, con agitación en zaranda rotacional (Selecta) a 175 rpm (2,91 s<sup>-1</sup>) durante 1 h a temperatura ambiente. Las soluciones de Cr(VI) fueron preparadas a partir de un patrón primario de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> y obtenidas de una solución estándar de 5,0 mg.dm<sup>-3</sup> en volumétricos de 100 mL. Para el ajuste del pH en el intervalo de estudio (2- 8 unidades) se utiliza un pH-metro marca Patrocinic por adición de soluciones diluidas de HCl (Uni-chem) y NaOH (Uni-chem). La solución sobrenadante luego del experimento es filtrada por un filtro Milipore (White GSWP, 0,22 ± 0,2 µm) de 47 mm de diámetro. Una vez alcanzado el tiempo de contacto establecido de la solución con el adsorbente, se procede a la determinación de Cr(VI).

*b.- Influencia del tamaño de partícula en la adsorción de Cr(VI):* Previa a la evaluación de la influencia del tamaño de partícula en la remoción del Cr(VI), se realizó un análisis de la granulometría utilizando un vibrador con tamices de porosidad de 0,42; 0,297; 0,149; 0,125 y 0,074 mm. Posteriormente se procedió a la realización de los experimentos de adsorción en matraces enlarmeyers ajustándose al pH seleccionado según lo descrito en el epígrafe 2.2.a, utilizando 5,0 g.dm<sup>-3</sup> de biomasa a temperatura ambiente, a un nivel de concentración de Cr(VI) de 1,84 mg.dm<sup>-3</sup>, con agitación en zaranda a 175 rpm (2,91 s<sup>-1</sup>), durante 1h. Pasado este tiempo se procede de igual forma que en el experimento anterior.

*c.- Influencia de la dosis de adsorbente en la adsorción de Cr(VI):* Los experimentos fueron realizados por triplicado, utilizando 1, 2, 3, 4, 5 y 6 g.dm<sup>-3</sup> de biomasa seca a temperatura ambiente, con agitación en zaranda a 175 rpm (2,91 s<sup>-1</sup>) durante 1h. Dicha experiencia se realiza a los valores de pH y granulometría del adsorbente, obtenidos en experimentos anteriores, a un nivel de concentración de Cr(VI) de 1,84 mg.dm<sup>-3</sup>. La solución sobrenadante, pasado el tiempo de contacto, es filtrada con un filtro Milipore (White GSWP, 0,22± 0,2 µm) de 47 mm de diámetro, previa a la cuantificación de Cr(VI).

*d.- Determinación del tiempo de bioadsorción:* Se determina el tiempo donde más se adsorbe el metal, ensayando a los tiempos 30, 60, 90 y 120 min en las mismas condiciones de agitación y nivel de concentración del metal; así como al pH, granulometría y dosis de adsorbente seleccionados en los experimentos anteriores, la concentración de Cr(VI) fue determinada al inicio (tiempo 0) y al final de la experimentación.

*e.- Evaluación de la influencia de concentración inicial del metal para la remoción de Cr(VI) en las muestras analizadas:* Esta se realiza en las mismas condiciones de experimentación anterior. Los niveles de concentración estudiados fueron 1,0; 1,5; 1,84; 2,5 y 3,0 mg.dm<sup>-3</sup>, escogidos de acuerdo a los estudios reportados en la literatura y a los niveles de concentración en que se encuentra el cromo hexavalente, en los residuales más frecuentes en la provincia de Santiago de Cuba, Cuba.

#### **Determinación de los parámetros de equilibrio en la adsorción de Cr(VI), por la cáscara de coco seca:**

Para este estudio se trabaja la modelación del proceso de adsorción de Cr(VI) por los modelos de Langmuir y de Freundlich. En el primero el consumo de metal (mg de metal.g<sup>-1</sup> de biomasa) es calculado de acuerdo a la ecuación (1):

$$q = (C_0 - C_e)/X \quad (1)$$

donde: q-capacidad de bioadsorción, X- concentración de biomasa, C<sub>0</sub>- concentración inicial y C<sub>e</sub>- concentración del metal en disolución en función del tiempo.

El modelo cinético para la bioadsorción del metal fue:

$$\frac{dC}{dt} = K_1(q_m - q)C + K_2 * q \quad (2)$$

donde: K<sub>1</sub> y K<sub>2</sub>: son coeficientes de velocidad de adsorción y desorción respectivamente; C: concentración del ión metálico y q<sub>m</sub>: capacidad máxima de adsorción.

$$\frac{C_e}{q} = \frac{K_d}{q_m} + \frac{1}{q_m} C_e \quad (3)$$

$$Kd = \frac{K_1}{K_2} \quad (4)$$

Los parámetros de equilibrio K<sub>d</sub> y q<sub>m</sub> para la isoterma de Langmuir (Ecuación 3) fueron determinados con los valores de la pendiente (1/q<sub>m</sub>), e intercepto (K<sub>d</sub>/q<sub>m</sub>) por la regresión lineal obtenida de C<sub>e</sub>/q vs C<sub>e</sub>. (Pérez et al., 2009).

La ecuación general y la forma linealizada del modelo de la isoterma de Freundlich se expresa en las ecuaciones 5 y 6 como sigue:

$$q_e = K_f * C_e^{1/n} \quad (5)$$

$$\ln q = \ln K_f + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (6)$$

En las ecuaciones 5 y 6, K<sub>f</sub> es la capacidad máxima de adsorción (mol.g<sup>-1</sup>) y n es la intensidad de la adsorción, la cual está relacionada con la afinidad o fuerza de unión; K<sub>f</sub> y 1/n son determinados de la pendiente e intercepción resultantes de la gráfica lnq vs lnC<sub>e</sub>.

#### **Evaluación de la remoción de Cr(VI) por el adsorbente estudiado en una matriz real:**

Para la realización

de este estudio, la matriz real a estudiar fue el residual generado en el taller 1 de la fábrica fibrocemento de Santiago de Cuba. La experiencia se realiza a escala de laboratorio por triplicado en matraces erlenmeyers de 250 mL de capacidad a temperatura ambiente y en agitación ( $2,91\text{s}^{-1}$ ). La concentración del adsorbente, granulometría y tiempo de contacto escogidos fueron los que mostraron mejores resultados en soluciones sintéticas, según lo descrito en las experiencias anteriores. En cambio el proceso de adsorción fue llevado a cabo al pH del residual de la fábrica. Las determinaciones de cromo hexavalente se hicieron por triplicado y utilizando el procedimiento descrito en el epígrafe 2.1.c.

## Resultados y discusión

Las industrias que se dedican a la producción de materiales de fibrocemento como tanques, bebederos, caballetes, conexiones sanitarias, entre otras, se encuentran entre las que más inciden en la contaminación de las aguas. Esto se debe a que los residuos que generan en muchas de las operaciones, contienen metales en disolución que alcanzan rápidamente las aguas naturales, contaminando de esta manera los ecosistemas que impactan. Para lograr que estas industrias minimicen la contaminación al medio ambiente, se hace necesaria la búsqueda de alternativas de tratamiento para el vertimiento de residuales con contenido de metales, así como dar un mayor uso a los residuales que se generan.

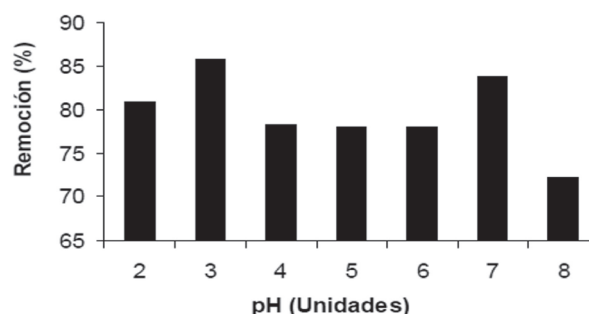
### Selección de las condiciones adecuadas para el proceso de adsorción de Cr(VI) por la cáscara seca de Cocos nucifera L.

La influencia de algunos factores como el pH, tamaño de partícula, tiempo, concentración de adsorbente y del metal en el proceso de bioadsorción, se deben tener en cuenta al estudiar detalladamente este proceso, por lo que se precisa la optimación de estas variables.

#### a. Selección del pH para la adsorción del Cr(VI)

El intervalo de pH objeto de estudio fue de 2 - 8 unidades. Ésta es una de las variables más importantes en el proceso de remoción de metales pesados, ya que la especiación del metal en la solución puede cambiar dependiendo de este valor (Volesky, 1990). La figura 1 muestra los resultados obtenidos, el mayor porcentaje de remoción de Cr(VI) fue observado en un valor de pH igual a 3 unidades, al cual corresponde un porcentaje de remoción de 85,9; a este valor de pH la especie predominante en la solución es el dicromato (Gaballah *et al.*, 1997). Entre 4 y 6 unidades se observa una disminución del porcentaje de remoción con valores inferiores al 80 %, mientras que a un valor de 7 unidades se observa un ligero incremento (83,8 %),

pero disminuye a 72,3 % a un valor de 8 unidades de pH. Según Huamán y Torem, el mejor porcentaje de remoción de Cr(VI) en cáscaras de coco fue observado en un valor de pH igual a 2 unidades alcanzando una remoción superior a 80 % (Huamán and Torem, 2008). A partir del valor de pH de 2,5 unidades la remoción disminuye a valores aproximadamente de 68 %. Muchos autores indican mejor remoción de Cr(VI) en un rango de pH de 2,0 a 3,0 unidades, sin embargo existen autores que reportan una mejor adsorción de este metal a 2 unidades de pH por cepas de hongos *Rhizopus arrhizus* y en levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en un rango de 1,5 - 2,5 unidades durante un tiempo de contacto de 4 h (Nourbakhsh *et al.*, 1994, Tewari *et al.*, 2005). Con respecto a las biomásas naturales, algunos autores reportan resultados satisfactorios a pH de 2,0 unidades para la corteza de eucalipto (Sarin and Pant, 2006) y para bagazo y pulpa de caña de azúcar (Sharma and Foster, 1994).



**Figura 1.** Influencia del pH en la remoción de Cr(VI) por cáscara de coco seca. Condiciones experimentales:  $C_0 = 1.84 \text{ mg/dm}^3$ ;  $a (2,91 \text{ s}^{-1})$ ;  $C (\text{biomasa}) = 5 \text{ g/dm}^3$  y tiempo de contacto de 1 hora.

Los resultados obtenidos muestran claramente la importancia del pH en el proceso de remoción de metales pesados. Su influencia en el proceso de biosorción de iones metálicos, se da por la competencia entre los iones del metal y los iones hidronio, presentes en la solución, por los sitios activos en la superficie de la biomasa. La dependencia de la captura de los iones por la biomasa en función del pH, puede justificarse por la asociación o disociación de algunos grupos funcionales presentes, como por ejemplo, los grupos carboxilo. Es conocido que a bajos valores de pH la mayoría de estos grupos no se encuentran disociados, no pudiéndose unir a los iones de los metales presentes en la solución; sin embargo pueden participar en reacciones de formación de complejos. Cuando el valor del pH aumenta, existe una mayor cantidad de grupos funcionales (carboxilo), que se encuentran cargados negativamente y son capaces de atraer iones con carga positiva (Chubar *et al.*, 2004; Selatnia *et al.*, 2004).

La influencia del pH en el proceso de biosorción de iones metálicos, se da por la competición entre los iones del metal y los iones H<sup>+</sup>, presentes en la solución, por los sitios activos en la superficie de la biomasa. La dependencia de la captura de los iones por la biomasa en función del pH puede justificarse por la asociación o disociación de algunos grupos funcionales presentes, como por ejemplo, los grupos carboxilo. Es conocido que a bajos valores de pH la mayoría de estos grupos no se encuentran disociados, no pudiéndose unir a los iones de los metales presentes en la solución, sin embargo pueden participar de reacciones de formación de complejos.

Cuando el valor del pH aumenta, una mayor cantidad de grupos funcionales (carboxilo) se encuentra cargada negativamente y es capaz de atraer iones con carga positiva (Chubar *et al.*, 2004; Selatnia *et al.*, 2004).

Según el comportamiento que debe ocurrir con el cromo VI a pH ácido, se debió observar una mayor eficiencia de remoción a pH 2 sin embargo no ocurrió así, esto pudo estar condicionado 1. A errores experimentales, es decir adición de menor cantidad de adsorbente, mayor volumen de disolución del metal, etc. 2. Error en la lectura de la muestra, 3. Pudo haberse formado conglomerado del adsorbente provocando una disminución en la adsorción.

Es importante mencionar que el Cr(VI) en solución acuosa puede formar diferentes hidrocomplejos, los cuales son estables, dependiendo del pH de la disolución y de la concentración total de Cr(VI) ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ,  $\text{HCrO}_4^-$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$  y  $\text{HCrO}_2^-$ ), estos dependen para su formación de la concentración de cromo y del pH de la disolución acuosa.

El cromo al estado de oxidación 6<sup>+</sup>, aparece en forma de cromato o dicromato. Estas dos especies coexisten en un equilibrio ácido-base representado por:  $2\text{CrO}_4^{2-}(\text{ac}) + 2\text{H}_3\text{O}^+(\text{ac}) = \text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}(\text{s}) + 3\text{H}_2\text{O}$  (amarillo a naranja). Es decir, los cromatos solo son estables en medio básico (pH mayor o igual a 7), en tanto que en medio ácido existirá el ión dicromato, de ahí que a pH de 7 unidades se observe un incremento en la adsorción.

Los valores bajos de pH provocan la protonación de la superficie del adsorbente, lo cual induce una fuerte atracción por los iones Cr(VI) de la solución cargados negativamente, por tanto la adsorción incrementa al aumentar la acidez de la solución. Sin embargo, cuando el pH aumenta, se incrementa la concentración de iones OH<sup>-</sup>, induciendo cambios en la superficie del adsorbente, impidiendo la adsorción de los iones Cr(VI) cargados negativamente por la biomasa, lo cual conlleva a la disminución de la adsorción del metal a esos valores de pH.

El mejor porcentaje de remoción fue observado en un valor de pH igual a 2 unidades, teniendo una remoción superior a 80 %. A partir del valor de pH de 2,5 la remoción disminuye para valores de aproximadamen-

te 68 %. Los resultados obtenidos muestran claramente la importancia del pH en el proceso de remoción de metales. Su influencia en el proceso de biosorción de iones metálicos, se da por la competición entre los iones del metal y los iones H<sup>+</sup>, presentes en la solución, por los sitios activos en la superficie de la biomasa. La dependencia de la captura de los iones por la biomasa en función del pH puede justificarse por la asociación o disociación de algunos grupos funcionales presentes, como por ejemplo, los grupos carboxilo.

#### b. Determinación de la influencia del tamaño de partícula en el proceso de adsorción.

Otro parámetro estudiado es el tamaño de partícula de la cáscara de coco; es conocido que la capacidad de adsorción de diferentes materiales varía de acuerdo con el tamaño de partícula; consecuentemente, la superficie de contacto entre el sorbente y la fase líquida (solvente) también tiene un papel importante (Huamán and Torem., 2008). Para el estudio de la influencia del tamaño de partícula de cáscara de coco en la eficiencia de remoción de los iones Cr(VI), fueron realizados experimentos utilizando diferentes rangos de granulometría. El tamaño de partícula osciló entre 0,41 mm hasta un tamaño de partícula menor que 0,074 mm. La concentración de biomasa utilizada fue de 5 g.dm<sup>-3</sup>, siendo el pH ajustado a 3 unidades, tiempo de contacto de 1 hora y posteriormente fue determinada la concentración de cromo hexavalente en el equilibrio (Ce).

La tabla 1 muestra los resultados alcanzados en el estudio de la influencia del tamaño de partícula en el proceso de bioadsorción. Se observa un incremento en los porcentajes de adsorción de Cr(VI) de 69,0 a 94,3 % de remoción con la reducción del tamaño de partícula. Huamán y Torem del estudio realizado sobre la adsorción de metales con tamaño de partícula de la cáscara de coco entre 0,297 y 0,044 mm, obtuvieron un ligero incremento en la adsorción de Cr(VI) con la reducción del tamaño de partícula (Huamán and Torem, 2008).

**Tabla 1.** Influencia del tamaño de partícula (PS) en la remoción de Cr(VI).

Tamaño de partícula (mm)	Ce (mg. dm <sup>-3</sup> )	Porcentaje de remoción (%)
0,41-0,296	0,57	69,02
0,296 - 0,149	0,40	73,36
0,148 - 0,125	0,49	78,26
<0,074	0,11	94,29

Es válido resaltar que la forma de la superficie de las partículas influye en la adsorción. Según Volesky (Volesky, 1090) las partículas de mayor tamaño con for-



mas esféricas, en general, presentan una adsorción mejor, debido a que tienen una mayor transferencia de masa comparadas con las partículas pequeñas; en este caso, esta mayor adsorción es atribuida a la transferencia de masa dentro de las partículas del sorbente. Cuando el proceso de adsorción de los iones de un metal en un sólido, se basa en la adsorción en la superficie de la partícula, ocurre una mayor adsorción en partículas más pequeñas. La capacidad de intercambio varía con el tamaño de la partícula, siendo más elevado en tamaños finos, por ser mayor su superficie específica.

#### c. Evaluación de la influencia de la dosis de adsorbente en la adsorción de Cr(VI)

La cantidad de adsorbente es el factor que va a limitar hasta cierto punto la concentración de metal que se adsorbe, es decir, a mayor cantidad de adsorbente, obtendremos una mayor adsorción, pero lo ideal es llegar a una relación de equilibrio, entre la cantidad de adsorbente y la concentración de metal, para lograr un resultado óptimo de adsorción. La experiencia fue realizada a un valor de pH de 3 unidades, a un tamaño de partícula menor que 0,074 mm,  $C_0$  de 1,84 mg.dm<sup>-3</sup>, a 2,91 s<sup>-1</sup> y tiempo de contacto de 1 hora.

La tabla 2 muestra un incremento en el porcentaje de remoción de cromo hexavalente a medida que aumenta la dosis de adsorbente de 1 g.dm<sup>-3</sup> a 6 g.dm<sup>-3</sup>, para alcanzar porcentajes de remoción de 64,2 y 94,6 respectivamente. Para la determinación de la existencia o no de diferencias significativas entre las medias de las concentraciones en el equilibrio, obtenidas para una dosis de adsorbente de 5 y 6 g.dm<sup>-3</sup>, fue realizado un contraste hipótesis donde:

Hipótesis Nula:  $\mu_1 - \mu_2 = 0,0$

Hipótesis Alternativa:  $\mu_1 - \mu_2 \leq 0,0$

Como resultado se obtuvo que dada una muestra de 3 observaciones con una media de 0,1 y una desviación típica de 0,03 y una segunda muestra, de 3 observaciones con una media de 0,099 y una desviación típica de 0,02, el estadístico t calculado es igual a 0,0012. Puesto que el p-valor para el test es superior o igual a 0,05, la hipótesis nula no puede rechazarse para el 95,0 % del nivel de confianza. Por lo antes expuesto se puede inferir que a partir de una dosis de cáscara de coco igual a 5 g.dm<sup>-3</sup> en la adsorción de Cr(VI), se alcanza rápidamente el equilibrio, lo cual coincide con lo reportado por Huamán y Torem, 2008.

#### d. Determinación del tiempo para la adsorción de Cr(VI) por la cáscara de coco seca.

El estudio del tiempo para la bioadsorción de Cr(VI), se determinó la cantidad de Cr(VI) adsorbida por la biomasa en el tiempo, (tabla 3). Los resultados infieren

que la adsorción del Cr(VI) es dependiente del tiempo, lo cual sugiere que la retención del ión, puede ser a través de la interacción con grupos funcionales localizados en la superficie de la biomasa utilizada. A partir de los 60 minutos de contacto del bioadsorbente con la solución estudiada, se absorbe el 94,6 % del Cr(VI) existente en el medio, alcanzando rápidamente el equilibrio. Autores reportan un tiempo óptimo de 60 min, para la remoción de plomo por cáscara de naranja (Pérez et al., 2007) y de 2 h para la remoción de Cr(VI) por la corteza de eucalipto (Sarín and Pant, 2006).

**Tabla 2.** - Porcentaje de remoción de Cr(VI) en función de la dosis de adsorbente.

Concentración del adsorbente (g.dm <sup>-3</sup> )	Ce (mg.dm <sup>-3</sup> )	Remoción (%)
1	0,65	64,2
2	0,53	70,7
3	0,45	75,5
4	0,4	78,3
5	0,1	94,6
6	0,099	94,6

**Tabla 3.** Influencia del tiempo de contacto de la cáscara de coco seca con la disolución de Cr(VI) en los porcentajes de remoción de este metal.

Tiempo (min)	Ce (mg.dm <sup>-3</sup> )	Remoción (%)
30	1,02	44,6
60	0,1	94,6
90	0,098	94,7
120	0,097	94,7

#### e. Evaluación de la influencia de concentración inicial del metal en la remoción de Cr(VI)

La influencia de la concentración inicial del metal en la remoción de Cr(VI), fue estudiada a los mejores valores de pH (3 unidades), tamaño de partícula (PS <0,074 mm), dosis de adsorbente (5 g.dm<sup>-3</sup>) y tiempo de contacto (1 hora) a 2,91 s<sup>-1</sup>. A valores bajos de concentración del metal (1,0; 1,5 y 1,84 mg.dm<sup>-3</sup>) la biomasa estudiada mostró los mayores valores de porcentaje de remoción (superiores al 90 %), sin embargo, para valores altos de concentración (2,5 y 3 mg.dm<sup>-3</sup>) se obtienen valores de remoción inferiores al 90 % (tabla 4). Algunos autores sostienen que la cantidad de metal adsorbido por biomasa de diferentes microorganismos, tales como *Mucor hiemalis* y *Rhizopus nigricans*, aumenta en proporción directa con el incremento de la concentración del ión metálico en disolución (Tewari et al., 2005; Bai and Abraham, 2001). Sin



embargo, en este trabajo la biomasa utilizada mostró la mayor capacidad de remoción a bajas concentraciones, resultados que coinciden con los obtenidos por Cárdenas *et al.*, (2011), quienes trabajaron en la adsorción de Cr(VI) con el hongo *Paecilomyces sp.*

**Tabla 4.** Influencia de concentración inicial del metal en la remoción de Cr(VI).

Concentración Cr(VI) (g.dm <sup>-3</sup> )	Ce (mg.dm <sup>-3</sup> )	Remoción (%)
1,0	0,02	98,0
1,5	0,08	94,7
1,84	0,12	93,5
2,0	0,33	86,8
3,0	0,56	81,3

#### **Determinación de los parámetros de equilibrio en la adsorción de Cr(VI) por la cáscara de coco seca**

Las isothermas de adsorción han sido ampliamente usadas para modelar el equilibrio de bioadsorción y para predecir la retención de los metales por los grupos funcionales de la pared celular en la superficie del adsorbente a diferentes concentraciones de metal y condiciones ambientales. Estas también predicen varios parámetros cinéticos y termodinámicos, que pueden ser utilizados para entender claramente el mecanismo involucrado en el proceso. El experimento para estudiar la capacidad que posee la biomasa obtenida a partir de la cáscara del fruto de la planta *Cocos nucifera L.*, se desarrolló en matraces erlenmeyers de 100 mL de capacidad, ajustándose los parámetros óptimos obtenidos para la adsorción de iones Cr(VI) en disoluciones acuosas estudiadas, a los niveles de concentración establecidos (tabla 4).

#### **Determinación de los parámetros de equilibrio (Kd y qmax) para el modelo de Langmuir**

La bioadsorción de iones metálicos, usualmente puede modelarse utilizando el modelo de Langmuir, el cual plantea que el aumento del consumo de metal por la biomasa, alcanza el equilibrio en función del tiempo (Chang and Hong, 1994). La tabla 5 describe los parámetros del modelo de Langmuir y el coeficiente de correlación para la bioadsorción del Cr(VI). La capacidad máxima de adsorción del metal (qm), alcanza un valor de 0,52 mg de Cr(VI) por g de cáscara de coco seca, a un valor de pH de 3 unidades, tamaño de partícula menor que 0,074 mm, dosis de adsorbente igual a 5 g.dm<sup>-3</sup> y tiempo de contacto de 1 hora.

La isoterma de Langmuir en el proceso de adsorción de cromo hexavalente por cáscara de coco seca, tiene un comportamiento lineal (0,9947). La tendencia lineal de este comportamiento en las condiciones del

experimento ( $C_{(biomasa)} = 5 \text{ g/dm}^3$ ;  $PS < 0,074 \text{ mm}$ ;  $pH = 3$  unidades; a  $2,91 \text{ s}^{-1}$  y tiempo de contacto de 1 hora) demuestra que el proceso puede estudiarse utilizando el modelo seleccionado; aunque normalmente este es más usado para el estudio de sistemas al estado gaseoso (Pérez *et al.*, 2010).

**Tabla 5.** Parámetros de equilibrio para del modelo de Langmuir en la adsorción de Cr(VI) por el polvo de la cáscara de coco.

q <sub>máx</sub> (mg/g)	Intercepto	Kd	R <sup>2</sup>
0,52	0,1075	0,056	0,9947

#### **Determinación de las constantes de Freundlich**

El modelo Freundlich considera que la afinidad de los sitios de unión en la superficie de la biomasa, varía con la interacción entre las moléculas adsorbentes, debido a que los sitios con una afinidad fuerte, son los que se ocupan primero y el aumento del consumo del metal por la biomasa, incrementa con el tiempo. Los resultados obtenidos por este modelo se observan en la tabla 6, donde la capacidad máxima de adsorción es de 1,862 mg de Cr(VI).g<sup>-1</sup> de biomasa de cáscara de coco seca y la intensidad de la adsorción es de 3,604. La intensidad está relacionada con la afinidad o fuerza de unión y con la distribución de los iones unidos a los sitios activos en la biomasa. Los valores de las constantes  $k_f$  y  $n$  (constantes de Freundlich) muestran que hay adsorción de Cr(VI) en la cáscara de coco seca.

**Tabla 6.** Constantes Freundlich, en la adsorción de Cr(VI) por el polvo de la cáscara de coco.

q <sub>máx</sub> (mg/g)	n	R <sup>2</sup>
1,862	3,604	0,9918

El comportamiento del proceso de adsorción, según el modelo de la isoterma de Freundlich tuvo una tendencia lineal en las condiciones experimentales estudiadas ( $C_{(biomasa)} = 5 \text{ g/dm}^3$ ;  $PS < 0,074 \text{ mm}$ ;  $pH = 3$  unidades; a  $2,91 \text{ s}^{-1}$  y tiempo de contacto 1 hora) lo que demuestra, que el proceso puede estudiarse utilizando el modelo seleccionado y que existen condiciones heterogéneas en la superficie del adsorbente; esto sugiere que todos los sitios de unión no van a estar igualmente favorecidos.

Del análisis realizado se puede deducir que el proceso de adsorción de Cr(VI) en la cáscara de coco seca, puede ser estudiado por los dos modelos, ya que los coeficientes de correlación están por encima de 0,98 (Langmuir (0,9947) y Freundlich (0,9918)) demostrando la tendencia lineal de cada proceso, aunque es ligeramente mayor por el modelo de Langmuir. La ca-

pacidad de adsorción de Cr(VI), es mayor por el modelo de Freundlich (1,862 mg de Cr(VI). g<sup>-1</sup> de cáscara de coco seca). Para obtener valores de capacidad máxima de adsorción superior, se debe realizar el estudio de los grupos funcionales que se encuentran en la superficie del adsorbente y aumentar su disponibilidad, utilizando diferentes sustratos. Según Almeida y col, se obtienen valores mayores de capacidad máxima de adsorción por la fibra de coco modificada que por la fibra natural (Sousa et al., 2007).

La eficiencia de adsorción de Cr(VI), por diferentes biomazas de microorganismos se muestra en la tabla 7. Si bien reportan valores de capacidad máxima de adsorción, superior por biomazas de especies microbianas, la capacidad máxima obtenida por la biomasa vegetal (cáscara de coco seca) utilizada en este estudio, se encuentra dentro de los valores reportados y es capaz de remover el 94 % del cromo presente en disolución, disminuyendo la concentración desde 1,84 mg.dm<sup>-3</sup> a 0,10 mg.dm<sup>-3</sup>.

El uso de la cáscara de coco como bioadsorbente, es ventajoso desde el punto de vista medio ambiental por dos razones: una, es capaz de remover cromo hexavalente el cual es perjudicial para todos los seres vivos y dos, permitirá aprovechar como materia prima, un desecho que se expone al medio ambiente en cantidades considerables.

### **Evaluación de la remoción de Cr(VI) por el adsorbente estudiado en una matriz real**

Pese a que el cromo es un elemento esencial para los seres vivos, niveles elevados de este metal (0,5 mg.dm<sup>-3</sup> en agua de ríos y 0,10 mg.dm<sup>-3</sup> en agua potable) resultan tóxicos a los mismos. (NC:27, 1999)

Particularmente, el Cr(VI) tiene efectos carcinogénicos en animales y mutagénicos en humanos y bacterias (Cervantes 2001). En las aguas residuales, el Cr(VI), se encuentra en solución como cromato o dicromato en dependencia del pH (Cotton and Wilkinson, 1980). En este trabajo se evaluó la posible utilización de la cáscara de coco seca, en la remediación del residual de la fábrica de fibrocemento de Santiago de Cuba, mediante el proceso de bioadsorción. Durante el proceso productivo se genera un aproximado de 38 430 m<sup>3</sup>/año.

Las muestras del residual, procedente del taller 1 de la fábrica de fibrocemento de Santiago de Cuba, con caudal de 38 430 m<sup>3</sup>.año<sup>-1</sup>, fueron tomadas antes y después del sistema de tratamiento establecido en la fábrica (decantador), para la posterior determinación de los parámetros químicos-físicos de importancia en el proceso de adsorción.

Los parámetros obtenidos del residual, después de aplicarle el sistema de tratamiento, fueron comparados con la norma cubana (521:2007) Clase E: Áreas marinas donde se desarrollan la actividad marítimo- portuaria. Los valores de pH y cromo hexavalente, están

**Tabla 7.** Capacidad de adsorción de Cr(VI) por algunas biomazas de especies microbianas.

Biosorbente	Q <sub>máx</sub> (mg.g <sup>-1</sup> )	Referencias
<i>Aspergillus foetidus</i>	2,0	Prasanjit y Smathi (2005)
<i>Aspergillus niger</i>	117,33	Khammbhaty et al. (2009)
<i>Rhizopus nigricans</i>	47,0	Bai y Abraham (1998)
<i>Rhizopus oligosporus</i>	126,0	Aniff et al. (1999)
<i>Rhizopus arrhizuz</i>	11,0	Bai y Abraham (1998)
<i>Rhizopus arrhizuz</i>	78,0	Aksu y Balibek (2007)
<i>Rhizopus sp.</i>	4,33	Zafar et al. (2007)
<i>Mucor hiemalis</i>	53,5	Tewan et al. (2005)
<i>Bacillus coagulans</i>	39,9	Srinth et al. (2002)
<i>Bacillus megaterium</i>	30,7	Srinth et al. (2002)
<i>Zoogloea ramigera</i>	2,0	Nourbakhsh et al. (1994)
<i>Streptomyces noursei</i>	1,2	Mattuschka y Straube (1993)
<i>Chlorella vulgaris</i>	3,5	Nourbakhsh et al. (1994)
<i>Cladophora crispate</i>	3,0	Nourbakhsh et al. (1994)
<i>Dunaliella sp.</i>	58,03	Donmez y Aksu (2002)
<i>Pachymeniopsis sp.</i>	225,0	Lee et al. (2000)
<i>Cocos nucifera</i> L.	1,862	En estudio

por encima de los límites máximos permisibles para las descargas de aguas residuales a las zonas costeras y cuerpos receptores (NC 521:2007), que es de (5,5-9,0 unidades) para el pH y de (0,2 mg.dm<sup>-3</sup>) para el Cr(VI), mientras que la temperatura sí está en norma, por lo que no constituye un factor con incidencia negativa en el cuerpo receptor. La conductividad se encuentra dentro del límite máximo permisible (3,5 mS.cm<sup>-1</sup>), regulado para el vertido de aguas residuales a cuerpos receptores según (NC 27:1999). Este análisis permitió demostrar que el sistema de tratamiento establecido en la fábrica es ineficiente, ya que dos de los parámetros están fuera de norma.

Experimentos anteriores (en soluciones sintéticas) demostraron que el pH influye en la remoción del Cr(VI), obteniéndose los mejores resultados a pH 3 unidades. La adsorción de Cr(VI) es del 83,75 %, a un valor de pH igual a 7 unidades y parámetros óptimos establecidos. De la evaluación de la remoción de Cr(VI) por la biomasa obtenida a partir de la cáscara de *Cocos nucifera* L., en una muestra del residual del taller 1 de la fábrica de fibrocemento de Santiago de Cuba, se obtuvo que para las condiciones de trabajo establecidas en los experimentos descritos en el epígrafe 1, el porcentaje de remoción del metal a un valor de pH de 3 unidades fue de 96,85 %, para una disminución del metal desde 0,35 mg.dm<sup>-3</sup> a 0,011 mg.dm<sup>-3</sup>; mientras que a un valor de 7 unidades, el porcentaje de remoción fue de 93,71 %, para una disminución del metal desde un 0,35 mg.dm<sup>-3</sup> a 0,022 mg.dm<sup>-3</sup>. En los experimentos realizados, la concentración de Cr(VI) se encuentra por debajo de los límites permisibles para las descargas de aguas residuales a las zonas costeras y cuerpos receptores (0,2 mg.dm<sup>-3</sup>) (NC 521:2007). La solución remanente para cada valor de pH, luego del bioproceso, se puso en contacto con biomasa seca nueva en las condiciones preestablecidas, lográndose la remoción del metal hasta valores no detectables por el método de determinación de Cr(VI), empleado para el análisis, lo cual evidencia que es posible la utilización de esta metodología como tecnología de tratamiento para este tipo de residual y así eliminar la contaminación de ocasiona la contaminación por Cr(VI) generada por el vertido de residuales del taller 1 de la fábrica de fibrocemento.

## Conclusiones

Los mejores valores de adsorción de Cr(VI) por la cáscara del fruto de la planta *Cocos nucifera* L se obtuvieron a pH de 3 unidades; tamaño de partícula menor que 0,074 mm; dosis de adsorbente de 5 g.dm<sup>-3</sup> y tiempo contacto 1 hora, lográndose a estas condiciones una disminución de la concentración de este metal (1,84 mg.dm<sup>-3</sup> a 0,1 mg.dm<sup>-3</sup>) lo cual representa una remoción de un 94,56 %; así como se remueve el 98 % del Cr(VI) cuando la concentración inicial es de 1 mg.dm<sup>-3</sup> y por debajo del 90 % a concentraciones superiores a 1,84 mg.dm<sup>-3</sup>. Este proceso puede ser es-

tudiado utilizando tanto el modelo de Langmuir como el de Freundlich, ya que el coeficiente de correlación para ambos modelos fue de 0,994 y 0,991 respectivamente, demostrando la tendencia lineal de cada proceso. La biomasa de la cáscara del fruto *Cocos nucifera* L. es capaz de remover los iones Cr(VI), a valores de pH de 3 y 7 unidades en el residual generado por el taller 1 de la empresa de fibrocemento de Santiago de Cuba, alcanzando porcentajes de remoción de 96,85 % y 93,71 % respectivamente. Además, se logra la remoción a valores no detectados por el método, cuando se pone en contacto la solución remanente con biomasa fresca.

## Referencias bibliográficas

- Aksu, Z. and Balibek E. 2007. Chromium (VI) biosorption by dried *Rhizopus arrhizus*: Effect of salt (NaCl) concentration on equilibrium and kinetic parameters. *Journal of Hazardous materials*. 145: 210-220.
- APHA. 1998. Standard Methods for the examination of water and wastewater, 20th Ed, Washington D.C. USA, 1193p.
- Ariff, A. B.; Mel, M.; Hasan, M. A.; and Karim, M. I. A. 1999. The kinetics and mechanism of lead (II) biosorption by powdered *Rhizopus oligosporus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 15(2): 291-298..
- Bai, R.S. and T.E. Abraham. 1998. Studies on biosorption of chromium (VI) by dead fungal biomass. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 57: 821-824.
- Buffle, J. and A. Scott. 1987. Interpretation of Metal Complexation by heterogeneous Complexants in Aquatic Surface Chemistry: Chemical Processes at the Particle - Water Interface, ed. E.p.W. Stumm.
- Cárdenas-González, J. F., y Acosta-Rodríguez, I. 2011. Remoción de cromo hexavalente por el hongo *Paecilomyces* sp. aislado del medio ambiente. *Información tecnológica*. 22(1): 9-16.
- Cervantes, C.; Campos-García, J.; Devars, S.; Gutiérrez-Corona, F.; Loza-Tavera, H.; Torres-Guzmán, J. C.; y Moreno-Sánchez, R. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*. 25(3): 335-347.
- Chang, J.S. and J. Hong. 1994. Biosorption of mercury by inactivated cells of *Pseudomonas aeruginosa* PU21 (Rip64) CSU: Characterization and comparison studies. *Biotechnology and Bioengineering*. 44: 999-1006.
- Chang, J.S., L. R. and C. C.C. 1997. Biosorption of lead copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water research*. 31: 1651-1658.
- Chubar, N., J.R. Carvalho, and M.J. Neiva. 2004. Cork biomass as biosorbent for Cu (II), Zn (II) and Ni (II). *Colloids and Surfaces*. 230: 57-65.
- Cotton, A. and G. Wilkinson, *Advanced Inorganic Chemistry*. 4<sup>th</sup> Ed. Chichester ed. 1980. Pp. 376-379.
- Donmez, C. and Z. Aksu. 2002. Removal of chromium (VI) from saline wastewaters by *Dunaliella* species. *Process Biochemistry*. 38: 751-762.
- Gaballah, I.; Goy, D.; Allain, E.; Kilbertus, G.; and Thauront, J. 1997. Recovery of copper through decontamination of synthetic solutions using modified barks. *Metallurgical and Materials Transactions B*, 28(1): 13-23.
- Huamán, G. and D.M.L. Torem. 2008. Bioadsorción de metales pesados contenidos en efluentes utilizando biomasa orgánica, en Departamento de Ciencia de los Materiales y Metalurgia, Pontificia. Universidad Católica de Rio de Janeiro.
- Hursthouse, A. 2001. The relevance of speciation in the remediation of soils and sediments contaminated by metallic elements - an overview and examples from Central Scotland. *Journal of Environmental Monitoring*. 3(1): 49-60.

- Jong T., Parry D.L., 2004. Adsorption of Pb(II), Cu(II), Cd(II), Zn(II), Ni(II), Fe(II), and As(V) on bacterially produced metal sulphides. *Journal of Colloid and Interface Scienc.* 275: 61-71.
- Kalbitz, K. and R. 1998. Wennric, Mobilization of heavy metals and arsenic in polluted wetland spills and its dependence on dissolved organic matter. *The Science of the Total Environment.* 209: 27-39.
- Khambhaty, Y.; Mody, K.; Basha, S.; and Jha, B. 2009. Kinetics, equilibrium and thermodynamic studies on biosorption of hexavalent chromium by dead fungal biomass of marine *Aspergillus niger*. *Chemical Engineering Journal.* 145(3): 489-495.
- Kim, S., H. Allen, and D. Cha. 2002. Influence of dissolved organic matter on the toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*: effect of complexation kinetics. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 21: 275-280.
- Lee, S.H., C.H. Jung, and H. Chung. 1998. Removal of heavy metals from aqueous solution by apple residues. *Process Biochem.* 33: 205-211.
- Lloyd, J.; Leang, C.; Hodges, M. A.; Coppi, M. V.; Cuifo, S.; Methe, B.; and Lovley, D. 2003. Biochemical and genetic characterization of PpcA, a periplasmic c-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochemical Journal.* 369: 153-161.
- Mattuschka, B. and G. Straube. 1993. Biosorption of metals by waste biomass. *Journal of Chemical Technology Biotechnology.* 58: 57-63.
- Norma Cubana NC 27:1999. Vertimiento de aguas residuales a las aguas terrestres y Alcantarillados. Especificaciones. Oficina Nacional de Normalización, La Habana. Cuba. 14.
- Norma Cubana NC 521:2007. Vertimiento de aguas residuales a la zona costera y aguas marinas. Especificaciones. Oficina Nacional de Normalización.: La Habana. Cuba. p. 14.
- Nourbakhsh, M.; Sag, Y., Özer, D., Aksu, Z.; Kutsal, T., and Caglar, A. 1994. A comparative study of various biosorbents for removal of chromium (VI) ions from industrial waste waters. *Process Biochemistry.* 29(1): 1-5.
- Pérez-Marín, A. B.; Zapata, V. M.; Ortuno, J. F.; Aguilar, M.; Sáez, J.; and Lloréns, M. 2007. Removal of cadmium from aqueous solutions by adsorption onto orange waste. *Journal of Hazardous Materials.* 139(1): 122-131.
- Pérez RM, Ábalos A, Gómez JM and Cantero D. 2009. Biosorption of chromium, copper, manganese and zinc by *Pseudomonas aeruginosa* AT18 isolated from a site contaminated with petroleum. *Bioresource Technology.* 100: 1533-1538.
- Pérez RM, Cabrera G, Gómez JM, Ábalos A and Cantero D. 2010. Combined strategy for the precipitation of heavy metals and biodegradation of petroleum in industrial wastewaters. *Journal of Hazardous Materials.* 182: 892-902.
- Prasanjit, B. and S. Sumathi. 2005. Uptake of chromium by *Aspergillus foetidus*. *Journal of Material Cycles and Waste Management.* 7: 88-92.
- Sarin, V. and K.K. Pant. 2006. Removal of chromium from industrial waste by using eucalyptus bark. *Bioresource Technology.* 97: 15-20.
- Selatnia, A.; Bakhti, M. Z.; Madani, A.; Kertous, L.; and Mansouri, Y. 2004. Biosorption of  $Cd^{+2}$  from aqueous solution by a NaOH-treated bacterial dead *Streptomyces Rimosus* biomass. *Hidrometallurgy.* 75(1): 11-24.
- Sharma, D.C. and C.F. Forster. 1994. A preliminary examination into the adsorption of hexavalent chromium using low-cost adsorbents. *Bioresource Technology.* 47: 257-264.
- Sousa, F.W., Moreira, S.A., Oliveira, A.G., Cavalcante, R.M., Nascimento, R.F., Rosa, M.F., 2007. The use of green coconut shells as adsorbents in the removal of toxic metals [in Portuguese]. *Quimica Nova.* 30: 1153-1157.
- Srinath, T.; Verma, T.; Ramteke, P. W.; and Garg, S. K. 2002. Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere.* 48(4): 427-435.
- Tewari, N., P. Vasudevan, and B. Guha. 2005. Study on biosorption of Cr (VI) by *Mucor hiemalis*. *Biochemical Engineering Journal.* 23: 185-192.
- Volesky, B., Biosorption of Heavy Metals. 1990. 396: 401- 410
- Zafar, S.; F. Aqil; and I. Ahmad. 2007. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresour. Technol.* 98: 2557-2561.



# Computer-aided design of bromelain and papain covalent immobilization

## Diseño asistido por computadora de la inmovilización covalente de bromelina y papaína

*Bessy Cutiño-Avila\**, *Dayrom Gil Pradas\*\**, *Carlos Aragón Abreu\*\*\**,  
*Yuniel Fernández Marrero\*\*\*\**, *Martha Hernández de la Torre\*\*\**, *Emir Salas Sarduy\*\**,  
*María de los Ángeles Chávez Planes\*\**, *José Manuel Guisán Seijas\*\*\*\*\**,  
*Joaquín Díaz Brito\*\**, *Alberto del Monte-Martínez\*\*\*\*\**

### Abstract

Enzymes as immobilized derivatives have been widely used in Food, Agrochemical, Pharmaceutical and Biotechnological industries. Protein immobilization is probably the most used technology to improve the operational stability of these molecules. Bromelain (*Ananas comosus*) and papain (*Carica papaya*) are cystein proteases extensively used as immobilized biocatalyst with several applications in therapeutics, racemic mixtures resolution, affinity chromatography and others industrial scenarios. The aim of this work was to optimize the covalent immobilization of bromelain and papain via rational design of immobilized derivatives strategy (RDID) and *RDID<sub>1.0</sub>* program. Were determined the maximum protein quantity to immobilize, the optimum immobilization pH (in terms of functional activity retention), was predicted the most probable configuration of the immobilized derivative and the probabilities of multipoint covalent attachment. As support material was used Glyoxyl-Sepharose CL 4B. The accuracy of *RDID<sub>1.0</sub>* program's prediction was demonstrated comparing with experimental results. Bromelain and papain immobilized derivatives showed desired characteristics for industrial biocatalysis, such as: elevate pH stability retaining 95% and 100% residual activity at pH 7.0 and 8.0, for bromelain and papain, respectively; high thermal stability at 30 °C retaining 90% residual activity for both immobilized enzymes; a catalytic configuration bonded by immobilization at optimal pH; and the ligand load achieve ensure the minimization of diffusional restrictions.

**Key words:** bromelain, covalent immobilization, immobilized derivatives, papain, rational design.

### Resumen

Las enzimas inmovilizadas han sido ampliamente utilizadas en las industrias Alimentaria, Agroquímica, Farmacéutica y Biotecnológica. La inmovilización de proteínas es, probablemente, la tecnología más empleada para elevar la estabilidad operacional de estas moléculas. La bromelina (*Ananas comosus*) y la papaína (*Carica papaya*) son cisteín proteasas extensamente usadas como biocatalizadores inmovilizados con disímiles aplicaciones en la terapéutica, resolución de mezclas racémicas, cromatografía de afinidad, entre otros escenarios industriales. El objetivo del presente trabajo fue optimizar la inmovilización covalente de las enzimas bromelina y papaína a través de la estrategia de diseño racional de derivados inmovilizados (RDID) y el programa *RDID<sub>1.0</sub>*. Se predijo la cantidad máxima de proteína a inmovilizar, el pH óptimo de inmo-

\* Microbióloga, Profesora, Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. e-mail: bvcutav.88@gmail.com.

\*\* Bioquímicos, Profesores, Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. e-mail: dayromgil@gmail.com, emirsalas@gmail.com, mchavez@infomed.sld.cu, jdiaz@infomed.sld.cu.

\*\*\* Bioquímico e Ingeniero Químico, Investigadores, Centro de Bioplantitas, Universidad de Ciego de Ávila, Carretera a Morón Km 9, CP 69450, Ciego de Ávila, Cuba. e-mail: eduardo@bioplantitas.cu, mhernandez@bioplantitas.cu

\*\*\*\* Bioquímico, Investigador, Centro de Inmunología Molecular, Calle 216 esq. 15, Atabey, Playa, CP 11600, La Habana, Cuba. e-mail: yuniel@cim.sld.cu.

\*\*\*\*\* Ingeniero Químico, Profesor e Investigador, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica CSIC, Canto Blanco, 28049, Madrid, España. e-mail: jmguisan@icp.csic.es.

\*\*\*\*\* Autor de correspondencia, Bioquímico, Profesor e Investigador, Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Calle 25 #455 e/ I y J, CP 10400, Plaza, Ciudad de La Habana, Cuba. e-mail: adelmonte@fbio.uh.cu.



vilización (en términos de retención de la actividad funcional), la configuración más probable del derivado inmovilizado y la probabilidad de enlazamiento covalente multipuntual. Como soporte de inmovilización se empleó Glioxil-Sepharose CL 4B. La precisión de las predicciones llevadas a cabo con el programa *RDID1.0* fue validada comparando con los resultados experimentales obtenidos. Los derivados inmovilizados de bromelina y papaína mostraron características deseadas para la biocatálisis a nivel industrial, tales como: elevada estabilidad al pH reteniendo el 95% y 100% de actividad residual a pH 7.0 y 8.0, para la bromelina y la papaína, respectivamente; una elevada estabilidad térmica con la retención del 90% de actividad residual a 30 °C para ambas enzimas; al pH de inmovilización óptimo la configuración obtenida es catalíticamente competente; y la carga de ligando alcanzada asegura la disminución de las restricciones difusionales.

**Palabras clave:** bromelina, derivados inmovilizados, diseño racional, inmovilización covalente, papaína.

**Recibido:** abril 15 de 2013

**Aprobado:** abril 1 de 2014

## Introduction

Enzymes are widely exploited in biocatalysis to produce a broad spectrum of fine chemicals, pharmaceuticals and their building blocks, as well as commodity and agrochemicals (Liu *et al.*, 2004). The weak nature of enzyme limits its application at industrial level, being one of the greatest problems in the biotechnological context (Soetaert and Vandamme, 2006; Mateo *et al.*, 2007; Iyer and Ananthanarayan, 2008; Hernández and Fernández-Lafuente, 2011).

The employment of enzymes in large-scale processes often encounters the problem of inactivation of enzyme. For example, at elevated temperatures enzyme undergoes partial unfolding due to the destruction of non-covalent interactions, and drastic pH variations affects the state of ionization of catalytical aminoacids. For technological and economical reasons, industrial processes have to be done by using immobilized enzyme derivatives. In particular, immobilization by covalent coupling retains very high enzyme activity over wide ranges of pH and temperature (Kunamneni *et al.*, 2008). The nature of the support and the methodology employed for immobilization results in diverse catalytic properties, stability, costs and handling properties. The alternative of using immobilized enzymes is advantageous because the enzyme could be recovered and usefully reused (Illanes, 2008; Hanefeld *et al.*, 2009).

Nowadays, affinity chromatography appears as one of the most efficient methods for protein separation and purification (Hage, 1999; Oh-Ishi *et al.*, 2002). The technique offers high selectivity, resolution, and usually high capacity for the molecule of interest; hence had been used on separation of natural or genetically synthesized proteins and peptides from complex mixtures (Polanowski *et al.*, 2003). Affinity chromatography has demonstrated its effectiveness on separation of proteolytic enzymes (employing substrates, substrates analogs, or proteases inhibitors as ligands) and its inhibitors (immobilized proteases as affinity matrix) (Delfin *et al.*, 1996; Anvar and Saleemuddin, 2002). Based on their importance in health and disease, protease inhibitors have already been developed into blockbuster drugs and diagnostics, many others are in clinical trials, and some proteases are themselves being trialed as vaccines or diagnostics (Abbenante and Fairlie, 2005).

Hence, the design, synthesis and purification of protease inhibitors may result in potential therapeutic agents (Hugli, 1996; Leung *et al.*, 2000).

Recently, the lack of guidelines that could manage the selection of the best conditions for immobilization opens new opportunities for effective strategies related to the rational design of immobilized derivatives (RDID). New mathematical algorithms and bioinformatics tools (implemented into the program *RDID1.0*) should be harmonically combined for designing an optimal immobilization process (Torres-Salas *et al.*, 2011; del Monte-Martínez and Cutiño-Avila, 2012). In this work, *RDID1.0* program was employed for the optimization of the covalent immobilization of the cysteine proteases bromelain and papain in Glyoxyl-Sepharose CL 4B support for synthesizing optimal affinity chromatography matrix for protease inhibitors purification. The accuracy of *RDID1.0* program prediction was evaluated with the obtained experimental results.

## Materials and methods

**Computational Methods:** Coordinate files were obtained from Worldwide Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb>). PROPKA was used to predict the pKa values of protein ionizable groups (<http://nova.colombo58.unimi.it/propka.htm>). The Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProtKB) was used to obtain functional information of proteins (<http://www.uniprot.org/>). *RDID1.0* program has been proposed recently for optimization the immobilization processes and allows to calculate the following parameters: ligand interacting groups reactivity (*LIGRe*), reactivity index (*RI*), protein diameter (*d*), theoretical maximum protein quantity (*tMQ*), operational effectiveness coefficient (*OEC*), and the estimated maximum protein quantity (*eMQ*) (del Monte-Martínez and Cutiño-Avila, 2012).

**Materials:** Bromelain (EC 3.4.22.32, PDB ID: 1W0Q) was gently donated by Bioplants Center, Ciego de Ávila, Cuba. Papain (EC 3.4.22.2, PDB ID: 9PAP) and bovine serum albumin (BSA) were provided by Fluka Chemie AG, Switzerland. The reagents: Coomassie Blue G-250 (Brilliant Blue G), NaHCO<sub>3</sub>, HCl, NaOH, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>, NaCl, 1,2-epoxypropan-3-ol,

NaBH<sub>4</sub>, and NaIO<sub>4</sub>, were obtained from Sigma-Aldrich Co, USA. Sepharose CL 4B was obtained from GE Healthcare, USA.

**Protein immobilization:** The initial protein quantity taken as a reference was the estimated maximum quantity (eMQ), calculated with *RDID1.0* program. Glyoxyl-Sepharose CL 4B support, prepared according to Guisán *et al.* (1988), was suspended in 100mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 100mM pH 8.0 or 100mM NaHCO<sub>3</sub> at pH 9.0 or pH 10.0; once the protein was added the final ratio support: immobilization solution was 1:10 (v:v). Then, the system was kept at 4°C under mechanical stirring during 2 hours. Finally, the appropriate amount of NaBH<sub>4</sub> was added to reduce the remaining aldehyde groups of the support to inert hydroxyl groups. In this way, the unstable Schiff's bases formed between the support aldehyde groups and protein amine groups were transformed into more stable covalent bonds. All experiments were performed at least by triplicate. The control parameter of the immobilization process calculated was the Differential Immobilization Grade (*diff. IG*) according to del Monte *et al.*, (2002).

**pH stability of soluble and immobilized enzymes:** The pH stability was determined by preserving soluble and immobilized enzymes in various buffers: 50 mM sodium acetate buffer (CH<sub>3</sub>COONa) pH 4-5, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6-7, 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM sodium bicarbonate buffer (NaHCO<sub>3</sub>) pH 9-11. The flasks were sealed and incubated during 2 h. Finally, the residual activity was measured under standard conditions.

**Thermal stability of soluble and immobilized enzymes:** The thermal stability was determined by preserving at various temperatures (range 10-60 °C) sealed flasks with soluble and immobilized enzymes for 2 h in the standard buffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.0). The residual activity was measured under standard conditions.

**Protein concentration:** Was determined by Coomassie Blue G-250 Assay using bovine serum albumin as standard protein (Bradford, 1976).

**Cystein protease assay:** Enzymatic activities of bromelain and papain were determined according to Mole and Horton (1973). The synthetic compound N-Benzoyl-DL-Arginine-p-Nitroanilide (BAPA) was employed as a substrate. This compound was dissolved initially in 115mmol/L of dimethyl-sulfoxide (Berger and Schechter, 1970). The reaction mixture contained: 30μL of enzymatic extract taken for the immobilization, 10 μL of 4mmol/L BAPA in 130μL of activity buffer (0.3 mol/L of sodium acetate, 2 mmol/L of EDTA, 20 mmol/L of cystein-HCl at pH 5.5), and 100μL of H<sub>2</sub>Od. The reaction was monitored by the increase of absorbance up to 405 nm due to the releasing of p-nitroanilide. Readings were taken every 15 seconds during 3 minutes. The p-nitroanilide extinction coefficient in these conditions was 8.33 cm<sup>-1</sup>·(mmol/L)<sup>-1</sup>. During pH stability studies of soluble and immobilized enzymes

the activity buffer was replaced with the same buffer used during the stability studies (50 mM sodium acetate buffer (CH<sub>3</sub>COONa) pH 4-5, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6-7, 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM sodium bicarbonate buffer (NaHCO<sub>3</sub>) pH 9-11).

**Specific Enzymatic Activity (Spec EA):** It was calculated as the ratio between the enzymatic activity and the protein concentration, and it was expressed in units of enzymatic activity (U) per mg of protein.

**Ligand Interacting Groups Reactivity (LIGRe)** is defined as the proportion between deprotonated (active) and protonated (inactive) ligand surface groups at immobilization pH (Torres-Salas *et al.*, 2011; Monte-Martinez and Cutiño-Avila, 2012). Theoretical bases for this calculation are considered on the classical Henderson-Hasselbalch equation (Equation 1) (Henderson, 1908; Hasselbalch, 1917).

$$pH = pKa + \log\left(\frac{A^-}{AH}\right) \quad (1)$$

Where pH is the immobilization pH, pKa is the acidic constant of the analyzed group, A<sup>-</sup> and AH represents the deprotonated and protonated species, respectively. *LIGRe* is the relation (A/AH) (Equation 2), and the pKa values of protein's ionizable groups were calculated with the program PROPKA (Li *et al.*, 2005). *LIGRe* indicates the proportion among reactive and non reactive groups on the ligand surface at the immobilization pH.

$$LIGRe = 10^{(pH - pKa)} \quad (2)$$

**Reactivity Index (RI)** is defined as the probability of reaction of a single protein reactive group with the activated support (Equation 3).

$$RI = \frac{LIGRe}{LIGRe + 1} \quad (3)$$

**Support Interacting Residues (SIR)** are defined as the number of support interacting residues available to interact with at least the 10% of the ligand total area (so called Ligand Interacting Area, LIA) (Equation 4) (Cutiño-Avila *et al.*, 2013).

$$SIR = \frac{AG \times N_A \times 4\pi(MD / 2)^2 \times 0.1}{S_{BET}} \quad (4)$$

Where AG is the activation grade of the support, N<sub>A</sub> is the Avogadro's number, MD is the protein diameter, and S<sub>BET</sub> is the support surface area.

**Theoretical Maximum Quantity (tMQ)** is defined as the maximum protein quantity to immobilize per g of support (Torres-Salas *et al.*, 2011). In equation 5 MM is the protein molecular mass in Da and *mMQ* is the molar maximum protein quantity expressed in μmol per g of support.

$$tMQ = mMQ \times MM \quad (5)$$

**Estimated Maximum Quantity (eMQ)** is defined as the maximum protein quantity that could be immobilized per g of support. It is a correction of *tMQ* consider-

ring the relationship between support pore diameter (PD) and maximum protein diameter (MD), in order to quantitatively estimate how diffusional restrictions could affect the maximum protein quantity to immobilize (Cutíño-Avila *et al.*, 2013). eMQ is calculated according to equation 6, where OEC is the Operational Effectiveness Coefficient.

$$eMQ = tMQ \times OEC \quad (6)$$

**Practical Maximum Quantity (pMQ)** is defined as the protein maximum quantity that has immobilized in the practice when a study charge is made (Equations 7 and 8). When increments on protein load do not represent an increase of the differential immobilisation grade (*diff.IG*) (del Monte *et al.*, 2002), but it remains stable within a 3% of variability, that *diff.IG* is considered the pMQ. *diff.IG* is determined taking into account the initial and final protein concentration of each immobilisation process, it is expressed in mg of protein immobilised per gram of support [mg/g] (equation 9).

$$diff.IG = \frac{mg \text{ Prot. total}_{(Initials)}}{V_s} - \sum \frac{mg \text{ Prot. total}_{(F+W)}}{V_s} \quad (7)$$

$$\frac{diff.IG_i - diff.IG_{i+1}}{diff.IG_i} < 0.03 \quad (8)$$

$$pMQ = diff.IG_i \quad (9)$$

## Results and discussion

The covalent immobilization of bromelain and papain was carried in Glyoxyl-Sepharose CL 4B at different immobilization pH. To reach an optimum performance of the immobilized derivatives was applied the Rational Design of Immobilized Derivatives strategy using the program RDID<sub>1.0</sub>. Were optimized and characterized two of the most relevant factors that influence over immobilization: immobilization pH and enzyme loading.

### Predicting the most Probable Configuration

To determine the optimum immobilization pH and to predict the most probable configuration of the immobilized derivative was calculated the parameter *RI* (tables 1 and 2). For bromelain and papain in the three analyzed pH conditions, the highest probability of reaction with the activated support corresponds to the N-Term residue (N-Term). The configuration acquired by the immobilized derivative via the N-Term is catalytically competent in both cases, because the active site is orientated towards the pore's lumen (figure 1-A1 and figure 1-B1).

When selecting the optimum immobilization pH, besides that the most probable configuration must be catalytically competent, we look for raising the pH, and consequently increase the reactivity of the protein inte-

acting groups. The goal of these augment of reactivity is searching for multipoint covalent attachment and, in this way, considerably augment the stability of the immobilized biocatalyst.

**Table 1.** Reactivity Index (*RI*) of the interacting groups of immobilized bromelain in Glyoxyl-Sepharose CL 4B.

Residue	<i>RI</i> (pH 8.0)	<i>RI</i> (pH 9.0)	<i>RI</i> (pH 10.0)
N-Term	0.10	0.99	100
Lys40	0	0.06	0.41
Lys79	0	0.06	0.41
Lys179	0	0.05	0.37
Lys97	0	0.04	0.33
Lys90	0	0.04	0.30
Lys42	0	0.03	0.27
Lys144	0	0.03	0.27
Lys43	0	0.03	0.27
Lys59	0	0.03	0.24
Lys127	0	0.03	0.24
Lys64	0	0.03	0.24
Lys174	0	0.03	0.24
Lys175	0	0.03	0.24
Lys93	0	0.03	0.24

For both enzymes at pH 8.0 the *RI* of the N-Term is only the 10% (tables 1 and 2); while at pH 9.0 and 10.0 is almost 100%. At pH 9.0 increases the reactivity of several ε-amine of lysine (ε-Lys) but with an interaction probability to low (*RI* < 5%) (tables 1 and 2) and, consequently the most probable configuration remains via the N-Term. Nevertheless, at pH 10.0 are increased the *RI* of these ε-Lys (*RI* > 30%), as a consequence is enhanced the probability to obtain configurations with these residues within. Several of these ε-Lys are located in close proximity to the active site entry, which affects the catalytic efficiency of the immobilized derivative as shown in figure 1-A2 and figure 1-B2. Thus, RDID predictions lead to select pH 9.0 as the optimum immobilization pH.

The experimental results validate the predicted optimum immobilization pH. To corroborate this predictions the same amount of protein (2 mg/g Supp) was immobilized at three different pH (8.0, 9.0 and 10.0). Then the results were compared to determine which one of them showed the highest catalytic performance. In figure 2 are compared the catalytic efficiency of the three immobilized derivatives. The immobilized derivatives at pH 9.0 were more active than their homolog at pH 8.0 and 10.0. The difference is less noted between pH 8 and 9, because in both cases the most probable configuration acquired by the derivative is via the N-Term (tables 1 and 2). However, at pH 9.0 various ε-Lys are located around the N-Term, stabilizing



this configuration, and achieving a better orientation of the active center towards the pore's lumen, resulting favorably in the ligand-substrate interaction, and as a consequence the enzymatic activity is increase.

**Table 2.** Reactivity Index (*RI*) of the interacting groups of immobilized papain in Glyoxyl-Sepharose CL 4B.

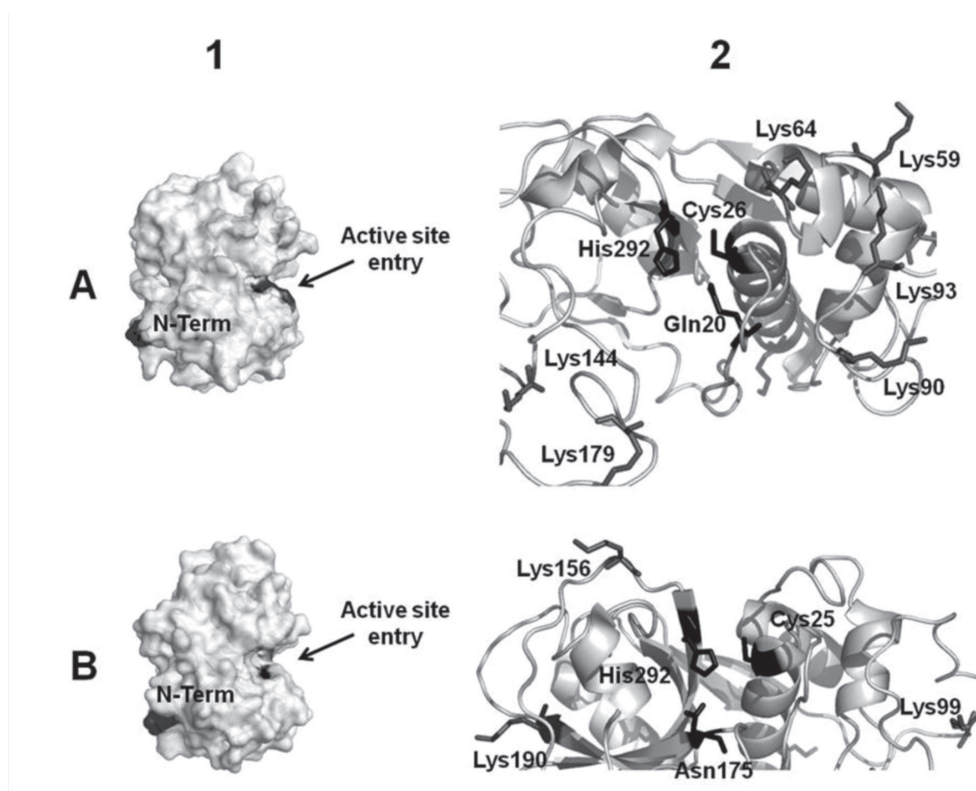
Residue	<i>RI</i> (pH 8.0)	<i>RI</i> (pH 9.0)	<i>RI</i> (pH 10.0)
N-Term	0.10	0.99	100
Lys10	0.01	0.10	0.53
Lys106	0.01	0.09	0.49
Lys39	0	0.05	0.37
Lys211	0	0.05	0.37
Lys100	0	0.05	0.33
Lys156	0	0.04	0.30
Lys190	0	0.03	0.24

### Analysis of the possibilities of Ligand- Support Multipoint Covalent Attachment

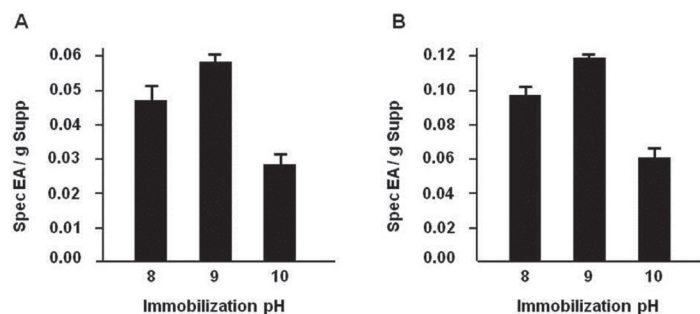
In covalent immobilization the multipoint-covalent attachment enzyme-support increases considerably the stability of immobilized proteins. Multipoint-covalent

attachment increases rigidity of immobilized enzymes inducing a higher resistance to conformational changes promote by heat, organic solvents, denaturizing agents, etc. (Guisán *et al.*, 1993; Mateo *et al.*, 2005; Mateo *et al.*, 2006). The probability of enzyme-support multipoint covalent attachment depends on the amount of carbonyl groups of the support available in the interaction zone with the ligand (*SIR*) and the number of interacting residues of the protein (*LIGRe*).

Was calculated the parameter *SIR* for each enzyme, considering a maximum activation grade of the support (71.42  $\mu\text{mol CHO/g Supp}$ ) (Guisán, 1988). The results for bromelain (*SIR* =21) and papain (*SIR*=14) indicate the existence of several carbonyl groups in the interaction area enzyme-support (10% of the ligand area). Theoretically can be formed 21 and 14 support-ligand bonds for t bromelain and papain, respectively. The results of *LIGRe* predictions were 15 reactive groups in (N-Term and 14  $\epsilon$ -Lys) for bromelain (table 1) and 8 groups (N-Term and 7  $\epsilon$ -Lys) for papain (table 2). This availableness of enzyme interacting groups in the surface conduces to the obtainment of multi-bounded immobilized derivatives. However, it is necessary to point out that these groups may not be localized inside the same interaction area (figure 3), defined in this case by the most probable configuration (figure 1-A1



**Figure 1.** *RDID1.0* program predictions. A) Bromelain. B) Papain. 1) Most probable configuration of the immobilized derivative through the N-Term. 2) In black the active site residues according to Dunn (1989) and Lecaille *et al.* (2002) for bromelain and papain, respectively. In dark grey  $\epsilon$ -Lys that can affect the catalytic activity of the immobilized derivative.



**Figure 2.** Specific enzymatic activities as function of immobilization pH. **A)** Bromelain immobilized derivatives at pH 8.0, 9.0, and 10.0. **B)** Papain immobilized derivatives at pH 8.0, 9.0, and 10.0.

and 1-B1), in both proteins via the N-Term. This result reduce from 15 to 5 (N-Term, Lys39, Lys42, Lys43, Lys127) for bromelain and from 8 to 5 (N-Term, Lys10, Lys39, Lys106, Lys211) for the papain the number of probable bonds with the support (figure 3).

For both enzymes the possibility of multipoint-covalent attachment with the support is viable (5 attachments), but there is differences in the residue's *RI* involved in the union to the support for each enzyme. The presence, in the interacting area support-enzyme of papain, of two residues ( $\epsilon$ -Lys10,  $\epsilon$ -Lys106) with a *RI*  $\sim 0.10$ , increase the velocity of multipoint-covalent attachment and the efficiency on the stabilizing effect (figure 3).

### Stability of soluble and immobilized enzymes

The effects of pH on stability of soluble and immobilized enzymes are shown in figure 4. Soluble bromelain was highly stable at pH range 6-9 retaining 80% residual activity after 2 h incubation, while at acid and basic pH stability was severely affected (figure 4A). In contrast, immobilized bromelain showed great stability at pH 4-11, keeping up to 60% residual activity (figure 4B). But the highest stability was raised at pH 7.0, 95% residual activity after 2 h incubation (figure 4B).

The stability of papain was dramatically enhanced after immobilization in Glyoxyl-Sepharose CL 4B support. Soluble papain showed residual activity up to 80% only at pH 7-8, stability decrease considerably at acid and alkaline pH (figure 4C). These results are consistent with the report of Liu and Hanzlik (1993), which demonstrate that papain showed highest stability at physiological pH values. Immobilized papain was extremely stable, retaining up to 50% residual activity after 2 h at pH 4-11 (figure 4D). Better residual activities were achieved at pH 7-9 (up to 90% residual activity in all cases). However, the highest stability was raised at pH 8.0, 100% residual activity after 2 h incubation.

The effects of temperature on stability of soluble and immobilized enzymes are shown in figure 5. The thermal stability of soluble bromelain was very low, with the residual activity being reduced to 70% from the

initial activity after preservation for 2 h at 30 °C. A drastic loss in activity was observed in further increase of temperature (figure 5A). In contrast, immobilized bromelain showed 90% residual activity during a 2 h exposure to 30 °C, and retained up to 60% residual activity after incubation 2 h at 60 °C (figure 5B). On the other hand, soluble papain was very stable at 40 °C, with 87% residual activity.

The thermal stability of soluble papain was very high, retaining 80% and 60% residual activity after preservation for 2 h at 30 °C and 40 °C, respectively. Further increase of temperature caused stability loss to 20% residual activity. On the contrary, immobilized papain showed high thermal stability retaining 90% residual activity after 2 h incubation at 30 °C, and 60% residual activity at 60 °C.

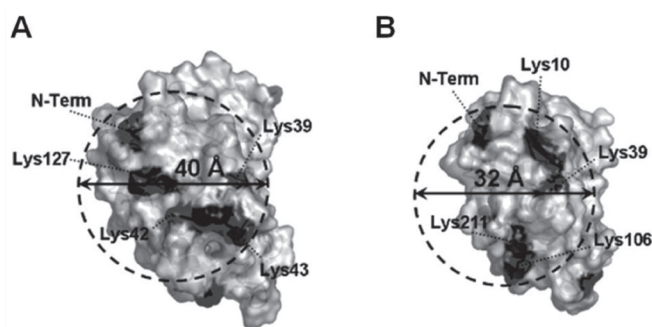
Both soluble and immobilized CPA, incubated at 30-50 °C, showed to be more stable at pH 7.0-8.0. Figure 5 shows that the stabilization of the immobilized enzyme (ratio between the half-life of the immobilized enzyme and half-life of the soluble enzyme) was higher at neutral-alkaline pH values than at acidic pH values. The achieved stabilization levels suggest that multipoint covalent attachments have promoted a real rigidification of the overall enzyme structure. This rigidification process is global but may not affect in the same way all portions of the biomolecule. In addition, the inactivation process may follow different mechanisms for acidic or for neutral/alkaline pHs. These facts could explain the lower stabilization of the immobilized papain at acidic pH values.

### Optimization of Protein Load

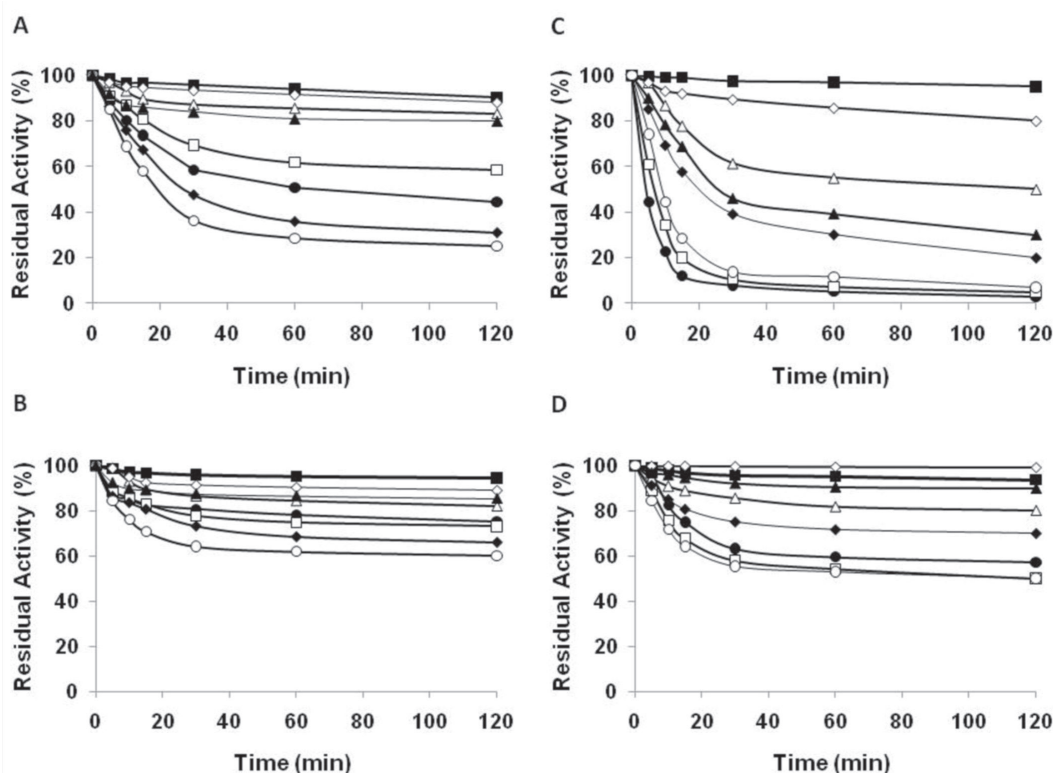
The selection of the support and the technique for the preparation of an optimal immobilized protein is dictated by the low diffusional resistance of the support in junction of with its ability to incorporate the optimal amount of protein per surface area.

To determine the optimum initial protein quantity in a load study, were calculated the parameters *tMQ* and *eMQ* using *RDID1.0* program. To demonstrate the accuracy of these predictions was carried out a load study,





**Figure 3.** Ligand interaction areas with the support (LIA) in the most probable configuration. **A)** Bromelain. **B)** Papain. (---) LIA. ( $\leftrightarrow$ ) LIA diameter in Å calculated with the program *RDID<sub>1.0</sub>*. (■) Ligand interacting residues in LIA that define the most probable configuration.

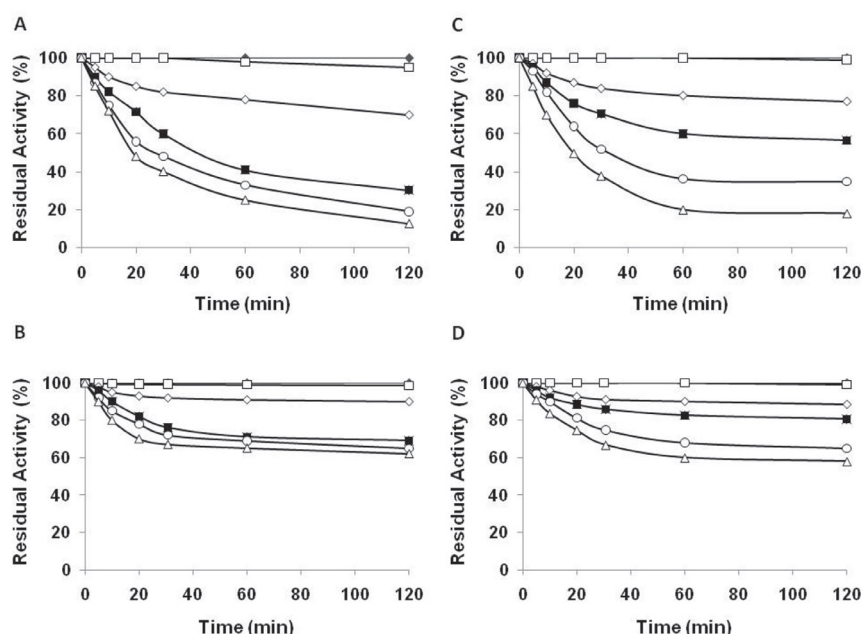


**Figure 4.** Effect of pH on stability of soluble and immobilized bromelain and papain (100% of the activity was the initial activity). **A)** Soluble bromelain after 2 h incubation. **B)** Immobilized bromelain after 2 h incubation. **C)** Soluble papain after 2 h incubation. **D)** Immobilized papain after 2 h incubation. (●) pH 4.0. (□) pH 5.0. (Δ) pH 6.0. (■) pH 7.0. (◇) pH 8.0. (▲) pH 9.0. (◆) pH 10.0. (○) pH 11.0.

was took as a reference the *eMQ* calculated, and 8 additional loads: 4 above and 4 below *eMQ*. The immobilization experiments were made at pH 9.0, which was the optimum immobilization pH validated, and they were followed by means of the determination of *diff.IC* for each assay. With the *diff.IC* values immobilization isotherms were constructed for each enzyme (figure 6). The isotherms allow evaluating how *diff.IC* behaves when protein charge increases.

As it can be seen in table 3, the *pMQ* values obtained experimentally were inferior to the predicted *tMQ*, but very similar to the *eMQ*. This is owing to *tMQ* are calcu-

lated assuming ideal conditions and restrictions to diffusion are not considered, this theoretical maximum value is only reached by very small molecules, as a result, *tMQ* is the maximum limit of protein to immobilize in a specific support. In the other hand, when calculating *eMQ* diffusional restrictions are taken into account over the protein quantity to immobilize. The immobilization isotherms corroborate these results. Both isotherms saturate at values nearly the predicted *eMQ*, and the inflection point indicates the maximum protein quantity that was immobilized in the practice. These results



**Figure 5.** Effect of temperature on stability of soluble and immobilized bromelain and papain (100% of the activity was the initial activity). **A)** Soluble bromelain after 2 h incubation. **B)** Immobilized bromelain after 2 h incubation. **C)** Soluble papain after 2 h incubation. **D)** Immobilized papain after 2 h incubation. (◆) 10 °C. (□) 20 °C. (◇) 30 °C. (■) 40 °C. (○) 50 °C. (Δ) 60 °C.

demonstrate the precision of *RDID<sub>1.0</sub>* program's predictions for optimization of protein load studies.

A critical requirement for any material to be used as a support for protein immobilization is the necessity to have a large surface area (small particle size or highly porous materials). The protein binding support capacity will depend on the pore diameter (PD) and tortuosity of the support, and also the protein size. This last one explains the highest adsorption capacity of papain

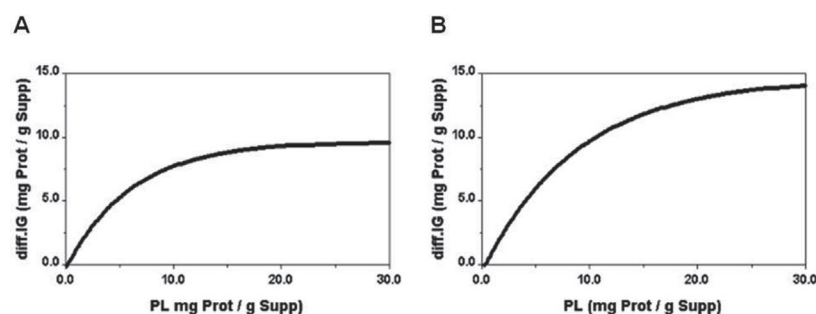
showed by Glyoxyl-Sepharose CL 4B. Papain is 12Å smaller than bromelain and consequently; the binding capacity of the employed support is higher for papain (0.99μmol/g Supp and 0.6μmol/g Supp for papain and bromelain, respectively).

## Conclusions

Optimization of immobilization conditions becomes as an important step to generate more robust and

**Table 3.** *RDID<sub>1.0</sub>* program's predictions and experimental results for bromelain and papain immobilization in Glyoxyl-Sepharose CL 4B.

Enzyme	<i>tMQ</i> (mg/g Supp)	<i>eMQ</i> (mg/g Supp)	<i>pMQ</i> (mg/g Supp)
Bromelain	45.96	12.4	9.97 ± 0.29
Papain	47.66	15.7	15.51 ± 0.34



**Figure 6.** Immobilization Isotherms in Glyoxyl-Sepharose CL 4B at pH 9.0. **A)** Bromelain. **B)** Papain. (**PL**) Protein load to immobilize. (***diff.IG***) protein quantity adsorbed on the support.

efficient biocatalyst. The employment of enzymes in affinity chromatography and bioconversion processes often encounters the problem of inactivation of enzyme. Bromelain and papain immobilized derivatives showed desired characteristics for industrial biocatalysis, such as: elevate pH stability retaining 95% and 100% residual activity at pH 7.0 and 8.0, for bromelain and papain, respectively; high thermal stability at 30 °C retaining 90% residual activity for both immobilized enzymes; a catalytic configuration bonded by immobilization at optimal pH; and the ligand load achieve ensure the minimization of diffusional restrictions.

Glyoxyl-Sepharose CL 4B supports seems to be very suitable matrix to obtain stabilized enzymes via multipoint-covalent attachment, but not every immobilization protocol allows achieving this goal. Following is propose and optimized protocol for immobilization-stabilization of bromelain and papain in Glyoxyl-Sepharose CL 4B:

- Immobilization at pH 9.0 in 100mM of NaHCO<sub>3</sub> during 2hrs.
- eMQ value as initial protein load: 12.4 and 15.7 mg of protein for bromelain and papain, respectively.
- Maximum support activation grade: 71.4 µmol CHO/g Supp.

The employment of *RDID<sub>1.0</sub>* program as the carrying out of the Rational Design of Immobilized Derivatives strategy allows selecting the best way to synthesize highly stabilized affinity matrix of bromelain and papain for protease inhibitors purification. *RDID<sub>1.0</sub>* predictions were highly accurate when comparing with experimental results in both cases. Besides, the use of this program permits improving the performance of the immobilized derivative in terms of catalytic efficiency.

## Acknowledgments

The authors wish to thanks to *INFORMATICA ddm*, Bergamo, Italy and Ibero-American

Program for Science, Technology and Development CYTED (ENZNUTnetwork), for the financial support assigned to Alberto del Monte Martínez for this work.

## References

Abbenante, G., Fairlie, D.P. 2005. Protease Inhibitors in the Clinic. *Medicinal Chemistry*. 1: 71-104.

Anvar, A., Saleemuddin, M. 2002. Purification and characterization of digestive alkaline protease from the larvae of *Spilosoma obliqua*. *Archiv. Insect Biochem. Physiol.* 51: 1-12.

Bradford, M.M. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.

Cutiño-Avila, B., Cunill-Semanat, E., Gil, D.F., Chávez, M.A., Díaz, J., del Monte-Martínez, A. 2013. Synthesis of Tetanus Toxoid-Sepharose CL 4B derivatives by Rational Design. In: Ruiz LL,

Susana B. V Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB 2011, IFMBE Proceedings 33. 800. ISBN 978-3-642-21197-3.

del Monte, A., Nolasco, H., Forrellat, A., Aragón, C., García, A., Díaz, J., Carrillo, O. 2002. Evidencias de la presencia de lipasas en el hepatopáncreas de *Litopenaeus schmitti*. CIVA 2002 (<http://www.civa2002.org>), *AquaTIC*. 6: 207-222.

del Monte-Martínez, A., Cutiño-Avila, B. 2012. Rational design of immobilized lipases and phospholipases. *J. Meth. Mol. Biol.* 861(4): 343-82.

Delfín, J., Morera, V., González, Y., Díaz, J., Márquez, M., Lario-nova, N., Saroyán, A., Padrón, G., Chávez, M. 1996. Purification, characterization and immobilization of proteinase inhibitors from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*. 34: 1367-1376.

Dunn, B. 1989. Protease mechanism. In: Beynon, R., Bond J. *Proteolytic Enzymes. A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford. 57-59.

Guisán, J.M. 1988. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilisation-stabilization of enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*. 10: 375-382.

Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R., Rodríguez, V., Bastida, A., Blanco, R.M., Alvaro, G. 1993. Enzyme stabilization by multipoint covalent attachment to activated pre-existing supports. In: Van del Tweel W.J.J., Harder A., Buitelaar R.M., editors. *Stability Stabilization of Enzymes*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher B.V. 55-62.

Hage, D.S. 1999. Affinity Chromatography: A review of Clinical Applications. *Clinical Chemistry*. 45: 593-615.

Hanefeld, U., Gardossi, L., Magner, E. 2009. Understanding enzyme immobilization. *Chemical Society Reviews*. 38: 453-468.

Hasselbalch, K.A. 1917. Die Berechnung der Wasserstoffzahl des Blutes aus der freien und gebundenen Kohlensäure desselben, und die Sauerstoffbindung des Blutes als Funktion der Wasserstoffzahl. *Biochemische Zeitschrift*. 78: 112-144.

Henderson, L.J. 1908. Concerning the relationship between the strength of acids their capacity to preserve neutrality. *Am J Physiol.* 21(4): 173-179.

Hernández, K., Fernández-Lafuente, R. 2011. Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. *Enzyme and Microbial Technology*. 48 (2): 107-122.

Hugli, L. 1996. Proteases inhibitors novel therapeutic applications and development. *Trends Biotechnol.* 14: 409-412.

Illanes, A. 2008. *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Springer. 391 pp.

Iyer, P.V., Ananthanarayan, L. 2008. Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*. 43 (10): 1019-1032.

Kunamneni, A., Ghazia, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, F.J., Alcalde, M. 2008. Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers". *Process Biochem.* 43(2):169-178.

Lecaille, F., Kaleta, J., Bromme, D. 2002. Human and Parasitic papain-Like Cysteine Proteases: Their Role in Physiology and Pathology and recent Developments in Inhibitor Design. *Chemical reviews*. 102(12): 4459-4488.

Leung, D., Abbenante, G., Fairlie, D.P. 2000. Protease inhibitors Current status and future prospects. *J. Med. Chem.* 43: 305-341.

Li, H., Robertson, A.D., Jensen, J.H. 2005. Very Fast Structure-Based Prediction Rationalization of Protein pKa Values. *Proteins*. 61: 704-721.

Liu, Z., Weis, R., Glieder, A. 2004. Enzymes from Higher Eukaryotes for Industrial Biocatalysis. *Food Technol Biotechnol.* 42 (4): 237-249.

Mateo, C., Abian, O., Bernedo, M., Cuenca, E., Fuentes, M., Fernández-Lorente, G., Palomo, J.M., Grazu, V., Pessela, B.C.C., Giacomini, C., Irazoqui, G., Villarino, A., Ovsejevi, K., Batista-Viera, F., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. 2005. Some spe-

- cial features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme and Microbial Technology*. 37 (4): 456-462.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernández-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernández-Lafuente, R. 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*. 40 (6):1451-1463.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fuentes, M., Betancor, L., Grazu, V., López-Gallego, F., Pessela, B.C.C., Hidalgo, A., Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. 2006. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme and Microbial Technology*. 39 (2): 274-280.
- Mole, J.E., Horton, R.H. 1973. Kinetics of papain-Catalyzed Hydrolysis of  $\alpha$ -N-Benzoyl-Arginyl-p-Nitroanilide. *Biochem.* 12 (5): 816-821.
- Oh-Ishi, M., Maeda, T. 2002. Separation techniques for high molecular mass proteins. *J. chromatography B*. 771: 49-66.
- Polanowski, A., Wilimowska-Pelc, A., Kowalska, J., Grybel, J., Zelazko, M., Wilusz, T. 2003. Non-conventional affinity chromatography of serine proteinases and their inhibitors. *Acta Biochimica Polonica*. 50: 765-773.
- Soetaert, W., Vandamme, E. 2006. The impact of industrial biotechnology. *Biotechnology Journal*. 1: 756-769.
- Torres-Salas, P., del Monte-Martínez, A., Cutiño-Avila, B., Rodríguez-Colinas, B., Alcalde, M., Ballesteros, A.O., Plou, F.J. 2011. Immobilized Biocatalysts: Novel Approaches and Tools for Binding Enzymes to Supports. *Adv. Mater.* 23: 5275-5282.



# Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un endulzante natural a través de explantes con meristemos pre-existentes

## Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni, a natural sweetener, through pre existing meristem explants

Isidro E. Suarez\*, Irma R. Quintero\*\*

### Resumen

Las hojas de *Stevia rebaudiana* son fuente de esteviosidos y rebaudiosidos, sustancias endulzantes con bajo contenido calórico. La propagación sexual y clonal de estevia es difícil debido a la calidad de la semilla y el tamaño reducido de la planta. Para evaluar la multiplicación, brotes establecidos *in vitro* fueron cultivados en ½ MS con cinco concentraciones de BAP (0.0, 2.22, 4.44, 8.88 y 17.6 µM). Posteriormente, los tallos multiplicados se subcultivaron en presencia de cinco concentraciones de ANA (0.0, 2.69, 5.37, 10.74 de 21.48 µM) para evaluar enraizamiento. Finalmente, tallos multiplicados sin enraizar, tratados o no con 0.4% de ANA, y otros enraizados *in vitro* fueron transferidos a condiciones *ex vitro*. Todos los experimentos fueron distribuidos usando un DCA. Los resultados indicaron que el medio 1/2MS adicionado con BAP indujo una mayor tasa de multiplicación. 10.74 µM de ANA indujo el mejor enraizamiento; sin embargo, los tallos sin enraizamiento resultaron en la mayor supervivencia *ex vitro*.

**Palabras clave:** estevia, esteviosido, micropropagación, reguladores de crecimiento vegetal.

### Abstract

*Stevia rebaudiana* Bertoni leaves are source of stevioside and rebaudioside, non-caloric sweetener substances. Seed and cutting estevia propagation is difficult due to seed sterility and small size plant, respectively. To evaluate shoot proliferation, *in vitro*-established estevia shoots were cultured in ½ MS with five (0.0, 2.22, 4.44, 8.88 and 17.6 µM) BAP levels. Thereafter, proliferated shoots were cultured on ½ MS with five NAA levels (0.0, 2.69, 5.37, 10.74 and 21.48 µM) to evaluate shoot rooting. Finally, non-rooted shoots, *in vitro*-rooted shoots and non-rooted shoots treated with a 0.4% NAA powder were transferred to *ex vitro* conditions. All experiments were distributed using a complete randomized design. The data indicated that BAP treated shoots showed a higher rate of shoot proliferation. An 87% of rooting and higher number of roots per explant was achieved with 10.74 µM of NAA. Non-rooted shoots transferred directly from Stage II showed the best survival rate.

**Key words:** Stevia, stevioside, micropropagation, plant growth regulator.

**Recibido:** febrero 15 de 2013

**Aprobado:** abril 4 de 2014

### Introducción

*Stevia rebaudiana* (Asteraceae) es fuente de esteviosidos y rebaudiosidos, unos glucósidos de diterpenos no tóxicos y no mutagénicos usados comercialmente como edulcorantes naturales bajos en calorías y propicios para pacientes diabéticos ya que no aumentan los niveles de glucosa en la sangre (Kinghorn y Soejarto, 1986; Ishima y Katayama, 1976; Tanaka, 1982; Matsui et al., 1996; Brandle, 2000). La propagación sexual de estevia es difícil debido a los bajos porcentajes de

germinación, dificultad para cosechar la semilla y los altos grados de variabilidad genética (Toffler y Orio, 1981). Alternativamente, el hábito de crecimiento y el tamaño limitado de la planta hacen la propagación por estacas lenta e ineficiente para producir grandes cantidades de plantas (Sakaguchi y Kan, 1992; Machado y Zaidan, 1995). La micropropagación ha mostrado ser un método que garantiza alta eficiencia y gran estabilidad genética en las plantas producidas; sin embargo, los estudios en producción masiva *in vitro* de plantas

\* Universidad de Córdoba, Departamento de Ingeniería Agronómica y Desarrollo Rural, Carrera 6 No. 76-103. Montería-Colombia. isuarez@sinu.unicordoba.edu.co. Fax: (57-1) (4) 786 0255

\*\* MSc. Universidad del Magdalena. Carrera 32 No. 22 - 08. Santa Marta - Colombia.

de estevia son limitados (Tamura *et al.*, 1984; Beshpalhok *et al.*, 1992), y las publicaciones recientes enfatizan la necesidad de técnicas para la producción *in vitro* de los esteviosidos y rebaudiosidos (Akita *et al.*, 1994; Bondarev *et al.*, 2001; Bondarev *et al.*, 2003) o incremento del material vegetativo vía organogénesis (Bondarev *et al.*, 2003; Jain *et al.*, 2009). El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar un método eficiente para producir masivamente plantas de estevia en condiciones *in vitro* mediante el cultivo de explantes con meristemas pre-existentes.

## Materiales y métodos

### Material vegetativo

Los explantes fueron colectados a partir de plantas de estevia variedad Morita I de aproximadamente dos meses de edad y en estado de desarrollo vegetativo plantadas en la Granja Experimental de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba, Montería – Colombia (8° 52" LN y 76° 48" LO). Las plantas fueron mantenidas en eras alzadas con incidencia controlada de luminosidad (polisombra del 50%) y riegos diarios por aspersión.

### Establecimiento y multiplicación

Los explantes, consistentes de segmentos de tallos con un par de yemas axilares (1.0 – 2.0 cm), fueron trasladados al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba (Montería – Colombia, 8° 52" LN y 76° 48" LO). Una vez enjuagados con agua potable por aproximadamente media hora, fueron desinfectados superficialmente con 1.25% hipoclorito de sodio por 15 minutos, enjuagados tres veces con agua estéril y establecidos en medios de 1/2 (MS) Murashige y Skoog (1962) y suplementado (en mg L<sup>-1</sup>) con sacarosa (30,000), myo-inositol (100), tiamina HCl (0.4) y TC-agar (Sigma®) (6,000), con cambios a medio fresco de la misma formulación cada tres semanas.

Los explantes, de 1.0 a 1.5 cm de longitud, se establecieron *in vitro* en medio 1/2 MS adicionado con cinco concentraciones de benzilaminopurina (BAP) (0.0, 2.22, 4.44, 8.88 y 17.6 µM). Estos fueron incubados durante cuatro semanas, al final de los cuales se evaluaron las variables de respuesta; tasa de multiplicación (número de nuevos brotes por explante), longitud promedio de los brotes (mm) y el número de nuevas hojas por planta producidas.

### Enraizamiento y aclimatización

Los tallos multiplicados fueron independientemente subcultivados durante cuatro semanas en 1/2 MS con cinco concentraciones (0.0, 2.69, 5.37, 10.74 y 21.48 µM) de ácido naftalenacético (ANA). Al final de perío-

do del cultivo se evaluó el porcentaje de enraizamiento, el número de raíces por tallo y la longitud promedio de raíces de cada tratamiento.

Los tallos enraizados *in vitro* y sin enraizar que se obtuvieron en la fase de multiplicación (sin tratamiento adicional o tratados con polvo enraizador al 0.4% de ANA en la base), fueron trasplantados en una mezcla de sustrato 1:1 (suelo:arena) contenida en bandejas plásticas de 30 alveolos cada una. Un total de 200 tallos por cada tratamiento fueron establecidos (600 unidades experimentales), los cuales fueron mantenidos cubiertos con una polisombra del 50% y con riego permanente durante ocho semanas, al final de las cuales se registró el número de plantas adaptadas a condiciones *ex vitro*.

### Consideraciones generales

El pH de todos los medios fue ajustado a 5.7-5.8 previo a la adición del agar y esterilizado a 121 °C y 1.1 kg-f cm<sup>2</sup> por 15 min. Los cultivos fueron mantenidos a 25 °C, con 12 horas de luz diaria (40 µM m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Los tratamientos de los experimentos *in vitro* fueron distribuidos con un diseño completamente al azar con 15 repeticiones por tratamiento, cada repetición consistió de un explante establecido en un recipiente y cada experimento fue repetido una vez. Los datos fueron analizados con un análisis de varianza con base en el modelo estadístico  $Y_{ij} = \mu + a_i + \varepsilon_{ij}$ , donde  $\mu$  es el promedio general,  $a_i$  fue el efecto de los reguladores BAP o ANA y  $\varepsilon_{ij}$  el efecto del error experimental. Los promedios fueron separados con la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

## Resultados

### Multiplicación

Los nuevos brotes crecieron a partir de los meristemas axilares presentes en los explantes (figura 1a y 1b). El análisis de varianza ( $Pr = 0.017$ ) y la separación de medias muestra que la presencia de BAP en el medio de cultivo incrementa significativamente el número de nuevos brotes producidos por cada explante en comparación al tratamiento control, alcanzándose un promedio máximo de 5.5 nuevos brotes por cada explante cuando el medio 1/2 MS es adicionado con 8.8 µM de BAP (tabla 1). Con la variable longitud de brotes, existieron diferencias significativas entre los tratamientos con y sin fitohormona, siendo el tratamiento control donde la longitud de los brotes resultó significativamente mayor ( $Pr = 0.0014$ ) comparado con aquellos desarrollados en los tratamientos suplementados con BAP (tabla 1). Con la variable número de hojas se encontraron diferencias significativas ( $Pr = 0.0150$ ) entre tratamientos siendo la menor concentración (BAP 2,22 µM) la que registró un valor significativamente mayor con 30.30 hojas por vitroplanta producida. A mayor

concentración de BAP se observa una disminución del número de hojas aunque para las concentraciones de 4.44 y 8.88  $\mu\text{M}$  de BAP el nivel de significancia es igual.

### Enraizamiento y aclimatización

El crecimiento de raíces adventicias ocurrió en todos los tratamientos (figura 1c); sin embargo, el mayor porcentaje de enraizamiento (87%) se registró en presencia de 10.74  $\mu\text{M}$  de ANA (tabla 2). El ANOVA permitió detectar diferencias estadísticas ( $P < 0.001$ ), mientras que la prueba de Tukey mostró que la presencia de 10.74  $\mu\text{M}$  de ANA en el medio indujo el mayor número de raíces por tallo. Diferencias significativas fueron igualmente detectadas ( $P < 0.0001$ ) con la variable longitud de raíces (tabla 2); sin embargo, las diferencias entre el tratamiento sin y con enraizador fueron mínimas, mostrando que el enraizamiento *in vitro* no fue necesario para la adaptación *ex vitro* de las plantas micropropagadas (figura 1d). El 67% de los tallos micropropagados sin enraizar y sin tratamiento exógeno con enraizador lograron adaptarse a condiciones *ex vitro*, seguido por los tallos enraizados *in vitro* (50% de supervivencia), mientras que solo el 33% de los tallos sin enraizar y tratados con 0.4% de ANA sobrevivieron.

### Discusión

Se determinó una tasa de multiplicación de 5.5 nuevos brotes por explante con la concentración de 8.88  $\mu\text{M}$  de BAP adicionado al medio de cultivo, lo cual representa un incremento en la tasa de multiplicación con una disminución en la concentración utilizada en estudios previos. Tamura *et al.*, (1984) reportaron el desarrollo de uno a tres nuevos brotes por explante de las mismas características cultivados en presencia de 9.29  $\mu\text{M}$  de kinetina y una tasa menor de multiplicación cuando la misma cantidad de kinetina fue utilizada en combinación con 1.07  $\mu\text{M}$  de ANA. Un comportamiento similar en cuanto a disminución de la tasa de multiplicación fue observado con la interacción ANA y

BAP utilizada para multiplicar brotes obtenidos a partir de explantes con meristemas pre-existentes (Suárez *et al.*, 2006). Sivarán y Mukundan (2003), trabajando con la variedad Morita II, reportaron una mayor tasa de multiplicación en presencia de 4.44 o 8.88  $\mu\text{M}$  de BAP registrando 6.3 y 8.5 nuevos brotes por explante, respectivamente, superando las tasas de multiplicación del presente estudio; sin embargo, en el actual estudio se registró una respuesta morfogénica más rápida obteniendo brotes de *Stevia rebaudiana* en menor tiempo. Bondarev *et al.* (2003) reportan que al comparar el efecto de 6.66  $\mu\text{M}$  de BAP solo o en combinación con 8.05  $\mu\text{M}$  de ANA en el medio de cultivo no se encontraron diferencias significativas; sin embargo, cuando se comparan estos tratamientos con el tratamiento control sin suministro de reguladores de crecimiento se obtiene un incremento de 1.5 veces en el número de nuevos brotes. Esto muestra que la interacción de ANA y BAP incide favorablemente no solo en el número de brotes/explante, sino también en el incremento del tamaño de los brotes producidos, lo cual contrasta con lo reportado por los resultados de Suárez *et al.* (2006) donde se observa una disminución significativa de la longitud de los tallos cuando BAP y ANA son combinados en el medio de cultivo. Anbazhagan *et al.* (2010) observaron una tasa de multiplicación de ocho nuevos tallos producidos a partir de explantes nodales con yemas axilares cultivados en un medio con 4.44  $\mu\text{M}$  de BAP y 8.05  $\mu\text{M}$  de ANA en un período de 40 días de cultivo. En la presente investigación se observó una disminución en la longitud de los tallos producidos en presencia de BAP, la cual se agudiza con el incremento de la dosis de esta fitohormona. Efectos similares fueron registrados por Bondarev *et al.* (2003) cuando adicionaron BAP en el medio.

Recientemente, Jain *et al.* (2009) reportaron incrementos significativos hasta de seis nuevos brotes caulinares a partir de explantes consistentes de hojas de estevia cuando estas fueron establecidas en medios suplidos

**Tabla 1.** Efecto de diferentes concentraciones de BAP sobre la multiplicación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

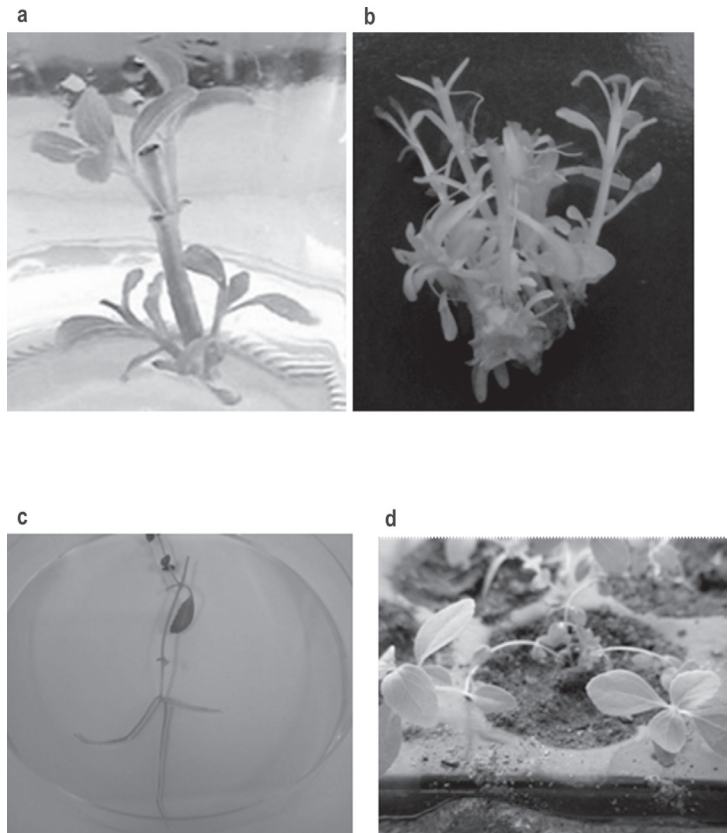
BAP ( $\mu\text{M}$ )	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas
0.00	1.78 b	6.21 a	15.11 b*
2.22	4.86 a	1.53 b	30.30 a
4.44	4.89 a	1.96 b	21.70 ab
8.88	5.50 a	1.95 b	21.00 ab
17.76	4.60 a	1.64 b	18.00 b
Media	4.32	2.66	21.22
$r^2$		0.93	0.88
C.V.		3.23	5.17

\* Valores con la misma letra dentro de columnas no difieren significativamente (Tukey  $P \leq 0.05$ )

**Tabla 2.** Efecto de diferentes concentraciones de ANA sobre el enraizamiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

ANA (μM)	Enraizamiento (%)	Número de raíces por tallo	Longitud de raíces (cm)
0.00	60	1.20 b	2.79 a
2.69	77	2.80 ab	2.87 a
5.37	80	2.46 ab	2.37 b
10.74	87	4.07 a	2.82 a
21.48	40	1.13 b	2.42 b
Media	68.8	2.33	2.25
r <sup>2</sup>		0.89	0.91
C.V.		5.42	4.96

Valores con la misma letra dentro de columnas no difieren significativamente (Tukey  $P \leq 0.05$ )



**Figura 1.** Micropropagación de estevia: **a:** Establecimiento de explantes; **b:** Multiplicación de propágulo; **c:** Enraizamiento *in vitro*; **d:** Adaptación *ex vitro*.

con concentraciones de  $\text{CuSO}_4$  cinco veces por encima de la cantidad normal del medio MS. Estos resultados pueden considerarse en futuros estudios para incrementar las tasas de multiplicación a partir de explantes con meristemos pre-existentes.

Similamente a lo observado en la presente investigación, reportes anteriores muestran poca correlación con respecto a los efectos de la presencia de BAP u otros reguladores sobre la producción de hojas *in vitro* de estevia (Sivaran y Mukundan, 2003; Bondarev *et al.*, 2003).

De acuerdo con los resultados, un incremento en el suministro de ANA favorece un mejor enraizamiento de los brotes micropropagados. Esto contrasta con lo reportado por Bondarev *et al.* (2003) quienes no observaron diferencias en el enraizamiento *in vitro* de estevia con ANA. A diferencia de Sivaran y Mukundan (2003) quienes reportaron un 100% de enraizamiento y un promedio de 12 raíces por tallo con  $4.9 \mu\text{M}$  de ácido indolbutírico (AIB), indicando que posiblemente el AIB tiene un mayor efecto auxínico sobre el enrai-



zamiento *in vitro* de estevia. Los resultados obtenidos en la fase de adaptación de plantas a las condiciones *ex vitro*, permiten obviar el estado de enraizamiento *in vitro*, lo cual permitiría reducir significativamente los costos y los riesgos de pérdida de material *in vitro*, como lo refieren Martin *et al.* (2003 y Lara *et al.* (2003). Los resultados permiten estimar una producción aproximada de  $4.5 \times 10^6$  nuevas plantas a partir de un solo explante en un año.

## Agradecimientos

Los autores del presente trabajo expresan sus agradecimientos a la Universidad de Córdoba y a la División de Investigaciones por su apoyo en la realización del presente estudio.

## Referencias bibliográficas

- Akita, M.; Shigeoka, T.; Koizumi, Y.; Kawamara, M. 1994. Mass propagation s shoots of *Stevia rebaudiana* using a large scale bioreactor. *Plant Cell Reports*. 13:180-183.
- Anbazhagan, M.; Kalpana, M.; Rajendran, R.; Natarajan, V.; Dhana-vel, D. 2010. *In vitro* production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 22(3):216-222
- Bespalhok, J.; Hashimoto, J.; Vieira, L. 1992. Factores influenciando a micropropagação *in vitro* de gemas axilares de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 4:59-61.
- Bondarev, N.; Reshetnyak, O.; Nosov, A. 2003. Effect of nutrient media composition on development of *Stevia rebaudiana* shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycosides. *Plant Science*. 165:845-850.
- Bondarev, N.; Reshetnyak, O.; Nosov, A. 2001. Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Sciences*. 161:155-163.
- Brandle, J. *Stevia*. Natures natural low calorie sweetener. [http://res2.agr.ca/London/faq/stevia\\_e.htm](http://res2.agr.ca/London/faq/stevia_e.htm). [Accedido el: 06-25-2006]
- Ishima, N.; Katayama, O. 1976. Sensory evaluation of stevioside as sweetener. *Reports National Food Research Institute*. 31:80-85.
- Jain, P.; Kachhwaha, S.; Kothari, S. 2009. Improved micropropagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in *stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni by using high sopper levels in the culture medium. *Scentia Horticulturae*. 119:315-319
- Kinghorn, A.; Soejarto, D. 1986. Sweetening agents fo plant origin. *Critical Review Plant Sciences*. 4:79-120.
- Lara, A.; Valverde, R.; Gomez, L.; Hidalgo, A. 2003. Micropropagación de la planta medicinal *Psychotria acuminata*. *Agronomía Costaricense*. 27:7-20.
- Machado, M.; Zaidan, L. 1995. Propagation of *Stevia rebaudiana* from stem cuttings. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 30:201-206.
- Martin, K.; Beena, M.; Joseph, D. 2003. High frequency axillary bud multiplication and *ex vitro* rooting of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr.–a medicinal plant. *Indian Journal of Experimental Botany*. 42:262-266.
- Matsui, M.; Matsui, K.; Kawasaki, Y.; Oda, Y.; Noguchi, T.; Kitagawa, M.; Sawada, M.; Hayashi, M.; Nohmi, T.; Yoshihira, K.; Ishidate, M.; Sofuni, T. 1996. Evaluation of the genotoxicity of stevioside and setviol using six *in vitro* and one *in vivo* mutagenicity assays. *Mutagenesis*. 11:573-579.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473-497.
- Sakaguchi, R.; Kan, T. 1982. Japanese studies on *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni and steviosidae. *Ci Culture*. 34:235-248.
- Sivaran, L.; Mukundan, U. 2003. *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*. *In Vitro Cell and Developmental Biology-Plant*. 39:520-523.
- Suarez, I.; Espitia, M.; Quintero, I. 2006. Efecto de auxinas y citocininas en la multiplicación y enraizamiento de *Stevia rebaudiana*. *Fitotecnica Colombiana*. 2006; 6(2):1-8.
- Tamura, Y.; Nakamura, S.; Fukui, H.; Tabata, M. 1984. Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by stem-tip culture. *Plant Cell Reports*. 3:183-185.
- Tanaka, O. 1982. Steviol-glycosides: new natural sweeteners. *Trends Anal Chemistry*. 1:246-248.
- Toffler, F.; Orio, A. 1981. Acceni sulla piñata tropicale 'Kaa-he-e' ou dolce'. *Rev. Soc. It. Sci. Aliment*. 4:225-230.

# Purificación y caracterización de lipopolisacáridos de *Eikenella corrodens* 23834 y *Porphyromonas gingivalis* W83

## Purification and characterization of lipopolysaccharide from *Eikenella corrodens* 23834 and *Porphyromonas gingivalis* W83

Diego Fernando Gualtero Escobar\*, Jeimy Paola Porras Gaviria\*\*, Sebastián Bernau Gutiérrez\*\*\*, Diana Marcela Buitrago Ramírez\*\*\*\*, Diana Marcela Castillo Perdomo\*\*\*\*\*, Gloria Inés Lafaurie Villamil\*\*\*\*\*

### Resumen

La purificación de lipopolisacáridos (LPS) o endotoxinas y su caracterización es un aspecto esencial para estudios que buscan aclarar el papel de estas biomoléculas de bacterias Gram negativas presentes en la cavidad oral y su relación con enfermedades locales periodontales y sistémicas. Este estudio implementa una metodología para la extracción, purificación y caracterización de LPS a partir de bacteria completa de *Eikenella corrodens* 23834 y *Porphyromonas gingivalis* W83, utilizando técnicas previamente descritas. La extracción cruda de LPS se realizó con fenol-agua caliente; la purificación se realizó con tratamiento enzimático con nucleasas y proteasa, seguido de cromatografía de exclusión por tamaño (Sephacryl S-200 HR) con deoxicolato de sodio como fase móvil. La caracterización de los extractos purificados se realizó por barrido espectrofotométrico, pruebas bioquímicas de electroforesis SDS-PAGE, ensayo Purpald y la prueba cromogénica de LAL. Como control para la identificación y caracterización de los extractos purificados se utilizaron LPS comerciales de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Rodobacter sphaeroides* y *Porphyromonas gingivalis*. La metodología implementada permitió la obtención de LPS de elevada pureza con la identificación de KDO o heptosas, un quimiotipo de LPS-S (liso) para *E. corrodens* y LPS-SR (semi-rugoso) para *P. gingivalis* W83. Ambos LPS purificados mostraron capacidad endotóxica a bajas concentraciones. La metodología implementada en este estudio para la purificación y caracterización de LPS a partir de bacteria completa fue eficiente al compararla con los LPS comerciales.

**Palabras clave:** endotoxinas, cromatografía, ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico (KDO), test LAL, periodontitis.

### Abstract

Purification of lipopolysaccharide (LPS) or endotoxins and its characterization is an important aspect for studies aimed at clarify the role of these biomolecules from Gram negative bacteria present in the oral cavity and its relationship with periodontal and systemic diseases. This study describes an extraction, purification and characterization method of LPS from *Eikenella corrodens* 23834 and *Porphyromonas gingivalis* W83. LPS extraction was performed by using hot phenol-water; the purification was done with nuclease and protease enzymatic treatment, followed by size-exclusion chromatography (Sephacryl S-200 HR) with sodium deoxycholate as mobile phase. The characterization of the purified extracts was performed by spectrophotometric scanning, SDS-PAGE biochemical tests, Purpald assay and chromogenic LAL test. As control, commercial LPS from *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *P. gingivalis*, and *Rodobacter sphaeroides* were used. The methodology mentioned above had allowed obtaining high purity LPS by identifying KDO or heptoses, a chemotype S-LPS (smooth) to *E. corrodens*; SR-LPS (semi-rough) for *P. gingivalis* W83. Both purified LPS showed endotoxic capacity at low

\* Candidato a Doctor en Biotecnología. Facultad de ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Magister en Bioquímica. Lic. Biología y Química. Autor de correspondencia: gualterodiego@unbosque.edu.co

\*\* Lic. Química. porrasyeimi@unbosque.edu.co

\*\*\* Candidato a Magister en Ciencias Básicas Biomédicas, Facultad de ciencias, Universidad El Bosque. Biólogo. gutierrezsebastian@unbosque.edu.co

\*\*\*\* PhD. Ciencias Farmacéuticas. Bacterióloga. buitragodianam@unbosque.edu.co

\*\*\*\*\* Candidato a Doctor en Biotecnología, Facultad de ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Magister en Microbiología. Bacterióloga. castillodiana@unbosque.edu.co

Directora Instituto UIBO. Magister en Epidemiología. Periodoncista. Odontóloga. investigaciones.odontologia@unbosque.edu.co  
Unidad de Investigación Básica Oral (UIBO)-Laboratorio de biotecnología-División de Investigaciones-Facultad de Odontología-Universidad El Bosque. Av. Cra 9 No. 131A - 02. Edificio de rectoría 2 piso

concentrations. The methodology used in this study for purification and characterization of LPS from the whole bacteria was efficient when it was compared with commercial LPS.

**Key words:** endotoxin, 2-keto-3-deoxyoctonate (KDO), Chromatography, Limulus test (LAL), periodontitis.

**Recibido:** abril 12 de 2013

**Aprobado:** abril 15 de 2014

## Introducción

Estudios epidemiológicos han encontrado una asociación de riesgo entre enfermedades infecciosas, como la periodontitis, con enfermedad cardiovascular (Elkaim *et al.*, 2008; Keschull, Demmer, y Papa-panaou, 2010). Se ha propuesto que esto sucede por el paso de bacterias viables y su degradación en plasma, con la posterior liberación de Lipopolisacáridos o endotoxinas (LPS), induciendo la secreción de citoquinas, las cuales han sido ampliamente involucradas en los procesos de enfermedad cardiovascular (Lafaurie *et al.*, 2007; Marchesan *et al.*, 2012; Pussinen *et al.*, 2007). Sin embargo, aún falta evidencia clínica e investigativa que sustente este hecho (Thomopoulos *et al.*, 2011).

Dentro de los factores de virulencia presentes en las bacterias Gram negativas se encuentran los LPS, polisacáridos de cápsula, fimbrias, hemaglutininas y proteasas (Curtis *et al.*, 2005). Los LPS inducen respuestas inflamatorias sistémicas en el hospedero que pueden estar relacionadas con riesgo cardiovascular aterosclerótico (Kallio *et al.*, 2008; Pussinen *et al.*, 2007; Wiedermann *et al.*, 1999).

Las bacterias Gram negativas sintetizan formas diversas de LPS denominadas Liso (S: *smooth*) y Rugoso (R: *rough*). LPS-S consiste de cadenas O-polisacáridas, que están constituidas de unidades repetidas de oligosacáridos, el núcleo de oligosacáridos y una región altamente conservada denominada el lípido A. Los LPS-R carecen de la cadena específica O y está conformada solo del núcleo de oligosacáridos y el lípido A. Existen cinco clases principales de LPS-R (Ra-Re) según la disminución en la constitución del núcleo de oligosacáridos (Raetz, y Whitfield, 2002). Los LPS-SR son aquellos que contienen el antígeno O pero en un menor grado de composición de polisacáridos (Hitchcock, y Brown, 1983). A pesar de las diferencias en estructura química y propiedades fisicoquímicas, los diferentes quimiotipos de LPS actúan como endotoxinas debido a que todos contienen la región del lípido A, la cual alberga el potencial de actividad biológica sobre las células.

*Porphyromonas gingivalis* es uno de los principales microorganismos que causa la progresión y severidad de la enfermedad periodontal. Es una bacteria anaerobia Gram negativa con forma de bacilo corto, que metaboliza principalmente péptidos y azúcares como fuente de energía (Lamont y Jenkinson, 1998). *E. corrodens* es un cocobacilo Gram negativo anaerobio facultativo de crecimiento difícil, habitante normal de la cavidad oral, con carácter de agente patógeno oportunista que se ha asociado con infecciones orales y no orales usualmente como parte de un consorcio microbiano (Jaramillo *et al.*, 2006).

*E. corrodens* está presente en placa subgingival de pacientes con enfermedad periodontal (Mayorga-Fayad *et al.*, 2007), y pertenece al grupo de las HACEK que ocasiona al menos el 1,4 % de las endocarditis infecciosas (Posch *et al.*, 2013).

Recientes estudios han identificado ácidos nucleicos de *E. corrodens* y *P. gingivalis* en lesiones ateroscleróticas de individuos con enfermedad cardiovascular y periodontitis (Padilla *et al.*, 2007). Sin embargo, también se encuentran en venas saludables (Elkaim *et al.*, 2007); por lo que no es claro el papel que desempeñan estos microorganismos en la inducción de enfermedades cardiovasculares. Cuando se relaciona un microorganismo con determinadas entidades clínicas se deben establecer los componentes por medio de los cuales es capaz de producir la enfermedad; es decir, los mecanismos de patogenia que se relacionan en forma directa con sus elementos estructurales, interacciones entre la misma especie y la presencia de un consorcio microbiano, lo que será útil no sólo para establecer si este microorganismo es realmente el agente causal de la enfermedad, sino también para aplicar una terapéutica eficaz (Jaramillo *et al.*, 2006).

Varios métodos se han reportado para la extracción de LPS que van desde la utilización de fenol, trizol, etanol-MgCl<sub>2</sub>, butanol (Darveau, Hancock, 1983; Galanos *et al.*, 1969; Morrison, Leive, 1975; Wu *et al.*, 1987). Sin embargo, el método más utilizado es el de Westphal que utiliza el fenol en agua caliente para extraer los LPS de tipo R o S, con un bajo contenido de proteínas (Apicella, 2008; Darveau, & Hancock, 1983; Westphal, and Jann, 1965). Estos métodos de extracción siguen vigentes en los procesos de purificación de LPS (Posch *et al.*, 2013).

Cuando se requiere valorar el potencial que tienen los LPS en inducir respuestas celulares específicas se necesita de procesos de purificación más rigurosos para eliminar posibles contaminaciones por otros factores de virulencia presentes en las bacterias Gram negativas (Curtis *et al.*, 2005; Hirschfeld, 2000). La presencia de ácidos nucleicos o proteínas que forman complejos fuertes cuando se realiza el método convencional con fenol deben ser valorados.

dos en los procesos de purificación de LPS (Perdomo, Rolando, 2006). En el presente estudio se implementa una metodología para la obtención de LPS de elevada pureza utilizando técnicas convencionales previamente descritas para la extracción, purificación y caracterización de LPS de bacterias periondo-patógenas, cuyos LPS no han sido anteriormente descritos en términos de sus características bioquímicas.

## Materiales y métodos

**Cultivo celular bacteriano.** Las bacterias de referencia *Eikenella corrodens* ATCC 23834 fueron adquiridas en la American Type Culture Collection y cultivadas en Laboratorio de Microbiología Oral de la Universidad El Bosque. Las cepas W83 de *P. gingivalis* y ATCC 23834 de *E. corrodens* fueron sembradas en agar Brucella (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.) enriquecido con 0,3% p/v de Bacto agar, 0,2% p/v de extracto de levadura, 5% v/v de sangre de cordero desfibrinada, 0,2% v/v de sangre hemolizada, 0,0005% p/v de hemina y 0,00005% p/v de menadiona e incubada en atmósfera de anaerobiosis con 9-13% de CO<sub>2</sub> a concentraciones por debajo del 1% de oxígeno (Anaerogen, Oxoid, Hampshire, England) a 36°C durante 7 días. Posteriormente, se observaron las características macroscópicas de las colonias y se realizaron pruebas bioquímicas con el fin de confirmar la pureza del cultivo.

*Porphyromonas gingivalis* se confirmó con la prueba de luz ultravioleta negativa y la prueba de CAAM positiva (NCBZ-GLY-GLY-ARG clorhidrato de 7-amido-4-metil coumarina, para la detección de enzimas tipo tripsina), *E. corrodens* fue confirmada por la presencia de oxidasa, y la ausencia de catalasa y motilidad, así como el uso de sistemas de identificación comercial Rapid ANA II (Remel™, Apogent). Se realizó una resiembra masiva de *P. gingivalis* con el fin de obtener 1,1 g de bacteria completa. Las colonias de *E. corrodens* fueron suspendidas en caldo ToddHewitt (Jaramillo *et al.*, 2006), se incubaron en condiciones de anaerobiosis durante 7 días con el fin de obtener 3,5 g de la bacteria. Pasado el tiempo de incubación se confirmó la pureza del cultivo, se recogió la totalidad de las colonias presentes en el cultivo se pasaron a un tubo Falcon® estéril previamente pesado con el fin de conocer el peso seco de la bacteria. La purificación del LPS se realizó una vez se comprobó la pureza de la bacteria. Las bacterias se conservaron a -80°C hasta la purificación del LPS.

**Purificación de LPS de *E. corrodens* ATCC 23834.** El procedimiento de extracción y purificación de LPS de *E. corrodens* se realizó según lo reportado por Gualtero y cols., (2008). La caracterización de este LPS se realizó como se describe más adelante.

**Extracción de lipopolisacáridos con fenol acuoso a partir de bacteria completa de *Porphyromonas gingivalis***

W83. A partir de 1.1 g de bacteria completa en 5.5 mL de agua USP se realizó la extracción con 18 mL de fenol al 90 % v/v y 18 mL de agua USP, incubando 10 min a 68 °C en agitación a 175 rpm (SHAKER BATH marca LaB – Line) e inmediatamente llevando a baño de hielo por 30 min. Posteriormente se centrifugó a 5000 g por 20 min a 6 °C, recuperando la fase acuosa. La fase fenólica fue de nuevo sometida a re-extracción dos veces más. Para eliminar las trazas de fenol en la fase acuosa se llevó a cabo una diálisis con membrana de tamaño de poro 10 kDa (SnakeSkin™. Thermo Scientific, USA) en 1 L de agua estéril grado I (Direct-Q3., Millipore) a 4 °C y con cambio de agua cada 8 horas por 3 días. El extracto obtenido fue centrifugado a 10000 g por 20 min, y al sobrenadante separado se le adicionó acetato de sodio a una concentración final 0.15 M. Para inducir precipitación se colocó la solución en baño de hielo, se adicionó etanol 96 % v/v gota a gota en agitación constante a una proporción 1:4 (muestra:etanol) con respecto a la cantidad de extracto resultante. La solución fue almacenada durante 24 h a - 20 °C para continuar con el proceso de precipitación. Posteriormente se centrifugó a 4000 g por 5 min a 4 °C, eliminando el sobrenadante y se determinó la masa del precipitado obtenido. Finalmente, se reconstituyó el precipitado en agua USP a una concentración final de 25 mg/mL y se liofilizó durante 24 h (HETO POWER DRY LL3000, Bomba Thermo Savant).

**Purificación de lipopolisacáridos de bacteria *Porphyromonas gingivalis* W83.** El procedimiento de purificación de LPS consistió en un tratamiento enzimático del extracto crudo, seguido de una separación por cromatografía de exclusión por tamaño.

**Tratamiento enzimático del extracto crudo de *Porphyromonas gingivalis* W83.** El procedimiento de digestión con nucleasas se realizó según lo reportado por Perdomo, & Rolando (2006). El extracto liofilizado se suspendió en 5 mL de buffer Tris 0.1 M - NaCl 0.15 M, pH 7.5, a una concentración final de 2,6 mg/mL. Se tomó una alícuota de 650 µL para análisis por espectrofotometría (BioRad, SamartSpec™ Plus. 200 nm – 400 nm). Consecutivamente se adicionó 500 µL de ribonucleasa A 0.5 mg/mL, 50 µL de desoxirribonucleasa 1 0.05 mg/mL, 100 µL de cloruro de magnesio 4 mM y se incubó a 60 °C durante 3 h. Posteriormente se adicionó 100 µL de proteinasa K 0.05 mg/mL, 100 µL de cloruro de calcio 1 mM incubando a 37 °C por 18 horas, se realizó diálisis y se liofilizó como se explicó anteriormente. Luego de cada proceso de digestión enzimática se tomó una alícuota para analizar su perfil espectrofotométrico.

**Cromatografía de exclusión por tamaño.** El liofilizado fue reconstituido a una concentración final de 5 mg/mL en 1 mL de buffer Tris 0.05 M HCl, 1.5 % p/v deoxicolato de sodio, EDTA 1 mM pH 9.5 y se adicionó a una columna para cromatografía de exclusión por tamaño (GE Healthcare HiPrep™ 16/60 Sephacryl™ S-200 HR)



previamente equilibrada con 200 mL del buffer mencionado. Se colectaron fracciones de 2.5 mL (Fraction Collector Bio-Rad Model 2110) a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min y se analizaron a 220 nm, 260 nm y 280 nm por espectrofotometría. Las fracciones de interés se determinaron en los picos o regiones con absorbancias más altas; posteriormente se realizó una precipitación con cloruro de sodio a una concentración final de 0.15 M, se agregó un volumen de etanol al 95 % cuatro veces mayor que el volumen de la fracción, a continuación se almacenaron las fracciones a - 20 °C durante 24 horas y luego se realizó la diálisis y se liofilizó. Se determinó la masa del liofilizado y se reconstituyó en agua USP a una concentración de 1 mg/mL, para su posterior caracterización.

**Caracterización de lipopolisacáridos de bacterias periodonto-patógenas.** Los extractos purificados fueron caracterizados bioquímicamente por electroforesis SDS-PAGE, el test colorimétrico Purpald, y el test cromogénico de LAL.

**Electroforesis SDS PAGE.** Se preparó el gel de separación al 12 % y el gel de concentración al 4% (Mini-PROTEAN® Tetra Cell. BioRad, USA). Se sembró 5 µg de lipopolisacárido de *Porphyromonas gingivalis* W83 y *Eikenella corrodens* ATCC 23834 en buffer Laemmli. También se sembraron como controles lipopolisacáridos comerciales de: *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (InvivoGen cat.#tlrl-3pelps), *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158 (InvivoGen cat.#tlrl-rslps), *Escherichia coli* 0111:B4 (InvivoGen cat.#tlrl-3pelps), *Escherichia coli* 0127:B8 (Sigma cat.#L3129), *Salmonella typhimurium* ATCC 7823 (Sigma cat.#L7261). El gel de concentración se corrió 45 minutos a 0.02 A; el gel de separación se corrió 1 h:30 min a 0.03 A. El proceso de tinción se realizó según lo reportado por Tsai, Frasch, (1982).

**Identificación de LPS en los extractos purificados por el ensayo Purpald.** El ensayo de Purpald para la identificación de LPS en los extractos purificados de *P. gingivalis* W83 y *E. corrodens* 23834 fue realizado según lo reportado por Lee & Tsai, (1999). Inicialmente se prepararon diluciones de KDO (ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico) de concentración 0.8 mM, 0.4 mM, 0.2 mM, 0.1 mM, 0.05 mM y 0.025 mM. Para lipopolisacáridos comerciales se prepararon concentraciones de 0,5 de: *Salmonella typhimurium* ATCC 7823 (Sigma), *P. gingivalis* ATCC 33277 (Invivogen), *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158 (Invivogen), *E. coli* 0111:B4 (Invivogen); y para *E. coli* 0127:B8 (Sigma) fue de 0.23 mg/mL. Con respecto a los LPS purificados de *P. gingivalis* W83 y de *E. corrodens* 23834 se prepararon a una concentración de 0.01 mg/mL. El blanco utilizado fue agua USP. Los datos fueron reportados en unidades de concentración milimolar (mM), teniendo en cuenta la transformación de datos de absorbancia con la curva de concentración conocida de KDO, lo que permitió la

identificación del LPS y la cuantificación de KDO presente en las muestras analizadas.

**Determinación de la capacidad endotóxica de los extractos purificados por LAL cromogénico.** La prueba LAL (Lisado de amebocitos de *Limulus*) es una prueba sensible y específica para la identificación de endotoxinas. Para la cuantificación se utilizó un kit LAL cromogénico con diazoacoplamiento (Pyrochrome, Cape Cod, USA) con una sensibilidad de 0,005 U.E./mL, según las recomendaciones del fabricante. Se sembraron en una microplaca de 96 pozos (certificada libre de pirógenos, Dynex) las siguientes muestras: blanco (agua libre de pirógenos), curva de control de endotoxina estándar (CSE) de concentraciones 5 U.E./mL, hasta 0,078 U.E./mL, dilución 1:2 y las muestras de LPS a diferentes concentraciones. Se adicionó 50 µL de reactivo LAL pyrochrome suspendido en 3,2 mL de buffer Glucashield (inhibidor de beta glucanos) y se incubó a 37 °C durante 25 minutos. Las absorbancias fueron registradas en un lector espectrofotométrico de microplacas a longitudes de onda de 570 nm. Cada una de las muestras fue valorada por duplicado y los datos fueron reportados como unidades de endotoxina por mililitro (U.E./mL) a partir de la transformación de datos de absorbancia de la curva de concentración conocida del CSE.

## Resultados y discusión

Los cultivos de *P. gingivalis* W83 y *E. corrodens* ATCC 23834 se confirmaron por morfología de las colonias con ayuda del microscopio estereoscópico a 4,5 aumentos y con pruebas bioquímicas previamente mencionadas las cuales resultaron concordantes con las bacterias evaluadas. La morfología del cultivo de *E. corrodens* es característica de colonias tipo 2 (Figura 1A). Las colonias son circulares con un margen irregular y un diámetro menor a 3mm. La colonia contiene un perímetro rugoso, opaca no reflejada y un centro umbonado húmedo que parece hundirse dentro del agar, como ha sido reportado por Chen, Wilson, (1990).

Las colonias de *P. gingivalis* en agar Brucella suplementado se observan después de la incubación como colonias oscuras que pueden ir desde un marrón claro hasta negro después de más de 7 días de incubación, son convexas con forma de domo brillantes (Figura 1B).

**Purificación de lipopolisacáridos.** A partir de un peso húmedo de bacteria completa para *P. gingivalis* y *E. corrodens* se obtuvo un rendimiento porcentual del 0,7% p/p y 0,02 % p/p, respectivamente (tabla 1). Esto indica que el proceso de extracción y purificación de LPS para *P. gingivalis* fue más eficiente.

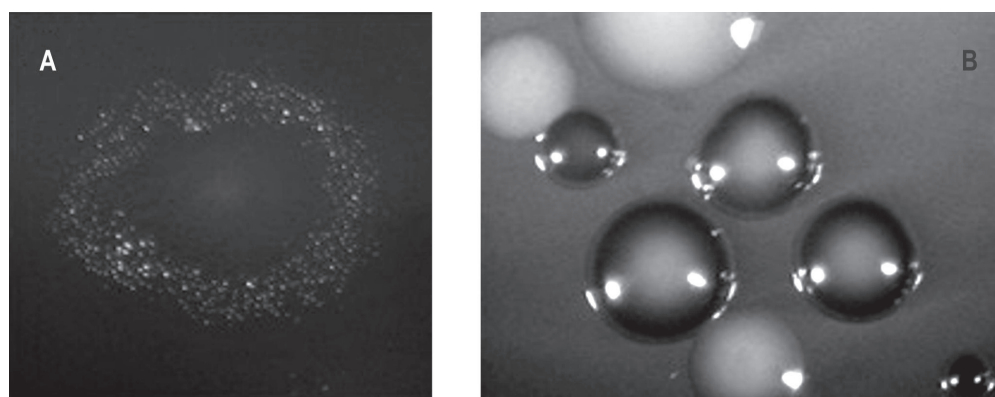
El proceso de purificación se realizó con tratamiento enzimático por nucleasas y proteasas. Posteriormente los extractos crudos eran purificados por cromatografía de exclusión molecular con una matriz de Sephacryl S-200 HR y una fase móvil de buffer de deoxicolato de

sodio. El perfil cromatográfico a diferentes longitudes de onda (220, 260 y 280 nm) para los extractos de *P. gingivalis* y *E. corrodens* se observan en la figura 2. Para el extracto de *E. corrodens* se observa un solo pico a un volumen de elución entre 50-70 mL aproximadamente (figura 2A). De igual manera se observa para el extracto de *P. gingivalis* pero a diferente volumen de elución (80-120 mL, figura 2B). El cromatograma de *P. gingivalis* indica que el tratamiento enzimático fue mucho más efectivo en reducir contaminación por ácidos nucleicos y proteínas que para el de *E. corrodens*. Las lecturas de absorbancia a 220 nm se hacen para LPS debido a que el deoxicolato absorbe a la misma longitud de onda (200 nm).

El efecto del tratamiento enzimático para los extractos de *P. gingivalis* se siguió por barrido espectrofotométrico 200-400 nm como fue reportado por Perdomo, Rolando, (2006), figura 3. Se observa cómo el tratamiento enzimático para degradar RNA, DNA y proteínas permite la depuración del extracto (figuras 3A-3D). Se identifican 2 picos de máxima absorción: el primero a los 223 nm, cercano al espectro de absorción de LPS y el segundo cercano a los 260 nm, lo que sugiere una contaminación por presencia de ácidos nucleicos (figuras 3C y 3D). Luego de la cromatografía de exclusión molecular, esta contaminación se reduce observándo-

se un solo pico (figura 4). Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros investigadores, quienes observaron que el principal contaminante luego de la extracción con fenol son los ácidos nucleicos y en menor proporción por proteínas (Perdomo y Rolando 2006; Yi y Hackett, 2000). Además la cromatografía de exclusión molecular con Sephacryl S 200 HR junto con el deoxicolato como fase móvil, permiten aún más la elución de impurezas que se asocian comúnmente a LPS en membranas, como ha sido previamente reportado (Gualtero y cols., 2008; Shands and Chun, 1980; Wu et al., 1987).

Luego de la cromatografía las fracciones de interés fueron recolectadas y sometidas a eliminación del deoxicolato por precipitación con NaCl y Etanol. El extracto de *E. corrodens* precipitó adecuadamente mientras que el de *P. gingivalis* no, por lo que se debió realizar una evaporación, seguida de diálisis y liofilización. El precipitado del extracto de *E. corrodens* fue suspendido en agua LWR, dializado y liofilizado. Se obtuvieron 0,8 mg de *E. corrodens* y 7,6 mg de *P. gingivalis* (tabla 1). Estos resultados indican que el proceso de purificación fue más eficiente para *P. gingivalis* que para *E. corrodens*. Probablemente la precipitación con NaCl no es eficiente para volver insoluble la muestra en la solución. Con respecto a la precipitación de *P. gingivalis*, se

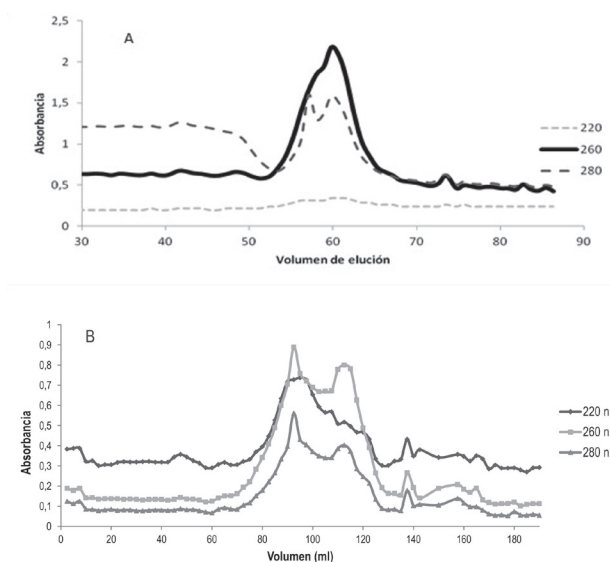


**Figura 1.** (A) Colonias de *E. corrodens* observadas con microscopio estereoscópico a 4,5 aumentos. (B) Colonias de *P. gingivalis* observadas con microscopio estereoscópico a 4,5 aumentos (fotografía tomada en el Laboratorio de Microbiología Oral de la Unidad de Investigación Básica Oral; Universidad El Bosque).

**Tabla 1.** Rendimientos del proceso de extracción y purificación de LPS.

Bacteria	Cantidad bacteria húmeda (mg)	Extracto crudo mg (%)	Extracto luego del tratamiento enzimático mg (%)	Extracto purificado (mg)
<i>P. gingivalis</i> W83	1100	12,9 (1,17%)	5 (0,45)	7.6 (0.7)
<i>E. corrodens</i> 23834†	3553	89,5 (2,5 %)	3,9 (0,11)	0,8 (0,02)

† Estos rendimientos fueron obtenidos a partir de la metodología reportada previamente (Gualtero y cols., 2008)



**Figura 2.** Perfil cromatográfico luego de la extracción y tratamiento enzimático. **(A)** *Eikenella corrodens* 23834. **(B)** *Porphyromonas gingivalis* W83. Se tomaron fracciones de 2.5 mL a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min y se midieron a 220 nm, 260 nm y 280 nm por espectrofotometría. A 220 nm se registra el lipopolisacárido, a 260 nm los ácidos nucleicos y a 280 nm las proteínas.

realizaron además pruebas con acetato de sodio (1M) como agente caotrópico, sin embargo tampoco indujo precipitación (datos no mostrados). Los rendimientos obtenidos en la purificación de LPS con el método de extracción con fenol son esperados que estén por debajo del 2% p/p, y aunque nuestros resultados están por debajo de este valor estos puede deberse a que la bacteria completa fue pesada húmeda y no liofilizada. Actualmente nuevos enfoques están siendo implementados para mejorar el rendimiento de purificación de LPS a un 3%, sin embargo siguen siendo bajos (Rybka *et al.*, 2008).

Los liofilizados fueron reconstituidos en agua LWR a una concentración de 1mg/mL y analizados por barrido espectrofotométrico (figura 4). Se registró los picos máximos de absorción a los 201 nm y 210 nm para *P. gingivalis* y *E. corrodens*, respectivamente que corresponde a la longitud de onda a la que absorben los LPS (Figura 4A y 4B). En ambos extractos no se registran picos a 260 y 280 nm, lo que sugiere que los extractos no contienen ácidos nucleicos y proteínas de consideración.

**Caracterización de lipopolisacáridos a partir de extractos purificados.** Los extractos purificados fueron sometidos a un proceso de caracterización bioquímica mediante electroforesis SDS PAGE, Purpald y test LAL.

El perfil electroforético permite definir el quimiotipo del LPS (figura 5). Los LPS de tipo liso se presentan en

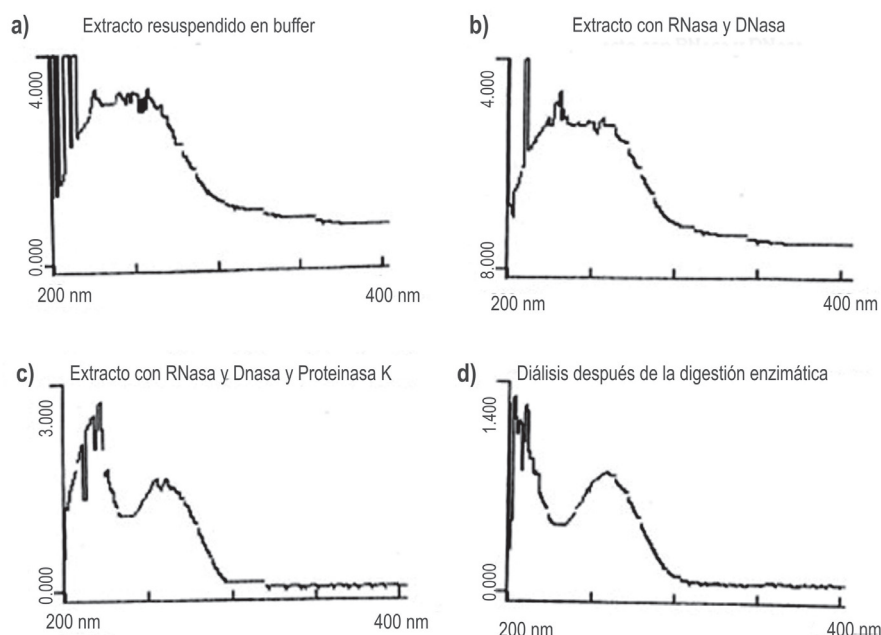
forma de bandas sucesivas en escalera y aquellos que son de tipo semi-rugoso o rugoso pueden presentar bandas de menor peso o la ausencia completa del perfil en escalera (Tsai, Frasch, 1982; Wang *et al.*, 2010).

Los lipopolisacáridos comerciales de *E. coli* y *S. typhimurium* presentan un perfil característico de LPS-S (liso), con bandas desde 66 a 14 kDa (carril 2-4, figura 5). El extracto purificado de *E. corrodens* presenta un perfil característico de LPS-S (carril 8). Por otro lado en el perfil del LPS comercial de *R. sphaeroides* hay ausencia de un patrón en escalera, pero si se observa una banda de bajo peso molecular por debajo de los 21 kDa. Este perfil es característico de LPS-R (rugosos), donde hay ausencia del antígeno O en la región polisacárido del LPS (Hitchcock & Brown, 1983). Un perfil similar también fue observado en el extracto purificado de *P. gingivalis* W83, con bandas tenues de bajo peso molecular (carril 7), lo que indica la presencia de LPS-SR (semi-rugoso).

Estos resultados son similares a los reportados previamente por Progulskis y Holt, (1984) para LPS de *E. corrodens* de la cepa 23834. En ese estudio la extracción la hicieron a partir de bacteria completa con fenol-agua caliente y la purificación fue realizada por tratamiento enzimático con nucleasas y proteasas sin un procedimiento de separación de impurezas como la cromatografía o centrifugación. La caracterización del quimiotipo del LPS fue hecha por SDS-PAGE identificando la presencia de LPS-S en los purificados. A diferencia del estudio de Progulskis & Holt, con la metodología implementada en este estudio se logró obtener LPS de elevada pureza libre de contaminantes como ácidos nucleicos y proteínas. En lo revisado en la literatura hasta el momento no existen estudios similares que determinen las propiedades bioquímicas y endotóxicas del LPS de *E. corrodens*.

Igualmente, no se han encontrado hasta el momento reportes en la literatura que describan las propiedades bioquímicas y endotóxicas de LPS de *P. gingivalis* W83. En un estudio realizado por Sismey-Durrant, Hopps, (1991), utilizó LPS de W83 para estimular fibroblastos *in vitro*. Sin embargo en ese estudio no se realizó una metodología que permitiera obtener LPS de elevada pureza así como tampoco se hizo la respectiva caracterización del purificado. El uso de métodos de extracción y purificación de LPS son un aspecto clave en la generación de extractos libres de impurezas que permitan su posterior uso en estudios en modelos celulares o *in vivo* (Hirschfeld *et al.*, 2000; Posch *et al.*, 2013)

La caracterización bioquímica del quimiotipo de LPS de *P. gingivalis* a partir de las cepas W83 y 33277 sugieren que estas cepas presentan diferencias en los procesos de biosíntesis de polisacáridos presentes en la región del antígeno O de los LPS, como ha sido reportado para la cepa W50 de *P. gingivalis*, observándose dos tipos de LPS, LPS-O y LPS-A con diferencias en la región polisacá-



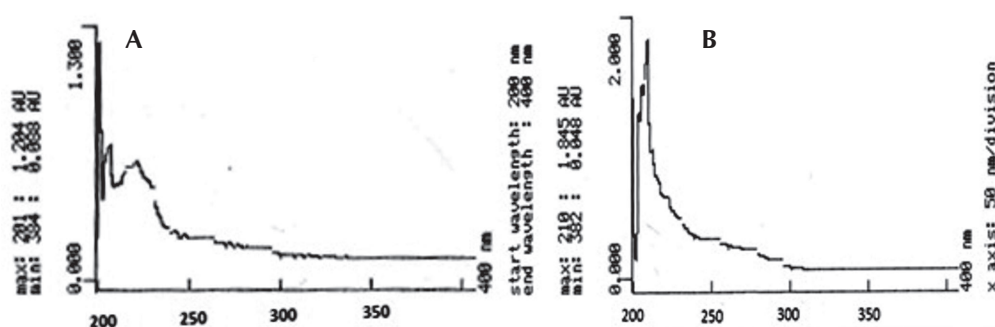
**Figura 3.** Barrido espectrofotométrico de 200 a 400 nm del extracto de *Porphyromonas gingivalis* W83 a través del proceso de purificación. **a)** Extracto liofilizado y resuspendido en buffer Tris 0.1 M - NaCl 0.15 M pH 7.5 posterior al proceso de extracción; **b)** Extracto luego del tratamiento con RNasa A 0.5 mg/mL y DNasa I 0.05 mg/mL; **c)** Extracto luego del tratamiento con proteinasa K 0.05 mg/mL; **d)** Espectro registrado después de realizada la cromatografía de exclusión por tamaño.

rida (Rangarajan *et al.*, 2008). Debido a la importancia de estas moléculas como factores de virulencia, variaciones estructurales del LPS pueden estar relacionadas con procesos de evasión o atenuación del sistema inmune del hospedero (Matsuura M, 2013).

Para verificar la presencia de proteínas en los extractos purificados, se realizó una electroforesis SDS-PAGE y posteriormente teñido con PageBlue (ThermoScientific, USA), que utiliza Coomassie G-250 para la tinción de proteínas (figura 6).

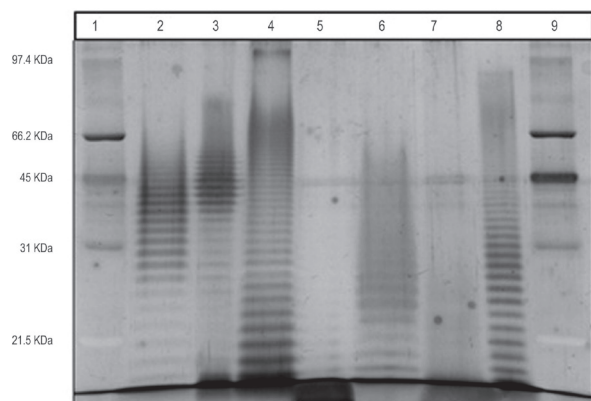
En las diferentes muestras, a excepción de la muestra del carril 8 (LPS *P. gingivalis* W83), se observa una banda con un peso aproximado de 45 kDa (figura 6). Se observa con diferente intensidad en LPS comerciales

que han sido purificados por diferentes métodos, según lo reportado en sus insertos (ver número de catálogo en metodología), carriles 3-6. Incluso se observa esta banda en el LPS de *E. coli* 0111-B4 de InvivoGen® (cat.#tlrl-3pelps), el cual es ultrapurificado con fenol-trietilamina-deoxicolato (carril 3). También se observan otra banda en el LPS comercial de *S. typhimurium* entre los 31 a 21 kDa (carril 4). Por el contrario, esta banda se observa en menor intensidad en los extractos purificados de *E. corrodens* (carril 10), *P. gingivalis* W83 (carril 7), y *P. gingivalis* 33277 (carril 9), obtenidos en este y previos estudios (Gualtero y cols., 2008). Estos resultados sugieren que los LPS obtenidos con la metodología implementada en este estudio permite



**Figura 4.** Barrido espectrofotométrico de 200 a 400 nm, luego del proceso de eliminación de deoxicolato. **A)** Extracto purificado de *P. gingivalis*. **B)** Extracto purificado de *E. corrodens* 23834. Las muestras fueron diluidas 1:10 en agua libre de endotoxinas.





**Figura 5.** Perfil electroforético de lipopolisacáridos presentes en bacterias. Carriles: **1.** Marcador de bajo peso molecular (5  $\mu$ L), **2.** LPS comercial de *Escherichia coli* (InvivoGen) (3  $\mu$ g/pozo), **3.** LPS comercial de *Escherichia coli* (Sigma) (5  $\mu$ g/pozo), **4.** LPS comercial de *Salmonella typhimurium* (50  $\mu$ g/pozo; Sigma), **5.** LPS comercial de *Rhodobacter sphaeroides* (3  $\mu$ g/pozo; InvivoGen), **6.** LPS comercial *Porphyromonas gingivalis* (1  $\mu$ g/pozo; InvivoGen), **7.** LPS *Porphyromonas gingivalis* W83 (5  $\mu$ g/pozo), **8.** LPS *Eikenella corrodens* 23834 (5  $\mu$ g/pozo), **9.** Marcador de bajo peso molecular (5  $\mu$ L).

la obtención de lipopolisacáridos con pureza igual o superior a los obtenidos comercialmente.

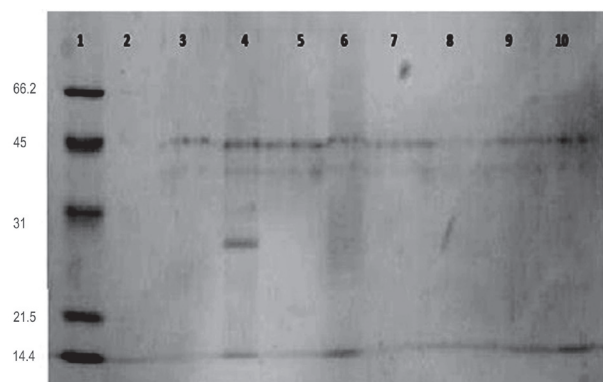
La presencia de proteínas o lipopéptidos formando complejos con LPS purificados ha sido reconocida y reportada en varios estudios (Hirschfeld et al., 2000; Manthey, Vogel, 1994; Reddi et al., 1995). Sin embargo, el uso de fenol en el proceso de re-purificación es el que más elimina este tipo de contaminación mezclado con otros reactivos como la trietilamina (Hirschfeld et al., 2000; Yi, Hackett, 2000; Wang et al., 2010). También se han propuesto otros protocolos que no utilizan fenol para la re-purificación de LPS, eliminando los complejos proteínas-LPS asociados utilizando solventes no inflamables (Lin et al., 2005; Tirsoaga et al., 2007). Nosotros utilizamos liofilizado del extracto purificado de *P. gingivalis* W83 reconstituido en buffer Laemmli 2X y desnaturizado por medio de ebullición posteriormente, observando una disminución en la señal a la altura de 45 kDa (figura 6, carril 8). Probablemente el complejo LPS-proteína en la muestra fue disociado por la acción denaturante del buffer (Laemmli, 1970).

Para cuantificar la concentración de proteína o péptidos presentes en los LPS comerciales y los extractos purificados de *E. corrodens* 23834 y *P. gingivalis* W83, se realizó una determinación por el método del ácido bicinonínico (Smith et al., 1985), utilizando un kit comercial con una curva estándar de albúmina desde 2000  $\mu$ g/mL a 25  $\mu$ g/mL (Thermo Scientific Pierce BCA

Protein Assay Kit. USA). Las muestras fueron diluidas en agua libre de endotoxinas o con buffer DOC a una concentración de 400  $\mu$ g/mL. Por esta metodología no se logró identificar y cuantificar proteína en ninguna de las muestras (datos no mostrados). Teniendo en cuenta estos resultados contradictorios no podemos asegurar la presencia de contaminación por péptidos o proteínas en las muestras de LPS comerciales y los extractos purificados. Se requiere de más experimentación que nos permita aclarar la naturaleza de las moléculas detectadas con una masa de 45 kDa por electroforesis SDS-PAGE.

*Identificación de LPS en los extractos purificados por el Ensayo Purpald.* Los LPS presentan en el núcleo de la región polisacárida, KDO y heptosas característicos en este tipo de glicoconjugados (Lee and Tsai, 1999). Mediante el ensayo Purpald se realizó la identificación de LPS en los extractos purificados de *E. corrodens* y *P. gingivalis* (tabla 2). Se observa en los diferentes LPS (comerciales o purificados) que no hay una correspondencia en cuanto a la concentración de la muestra y la concentración relativa de LPS en relación al KDO. Estas diferencias se deben a variaciones en el número de glicoles vecinales sin sustituir (UTVG) presentes en el KDO y heptosas al interior de cada uno de los LPS analizados (Lee and Tsai, 1999).

De esta manera se identifica la presencia de LPS en los extractos purificados de *E. corrodens* 23834 y *P. gingivalis* W83, observándose una mayor concentración de KDO en *P. gingivalis* que en *E. corrodens*, a pesar que fueron colocados a una misma concentración del extracto en solución.



**Figura 6.** Identificación de proteínas en LPS purificados y comerciales. SDS PAGE teñido con PageBlue (ThermoScientific. USA). Carril: **1)** Marcador de bajo peso molecular; **2)** ninguna muestra; **3)** LPS *E. coli* (Invivogen); **4)** LPS *S. typhimurium* (Sigma); **5)** LPS *R. sphaeroides* (invivogen); **6)** LPS *P. gingivalis* 33277 (Invivogen); **7)** LPS *P. gingivalis* W83 (H20); **8)** LPS *P. gingivalis* W83 (laemmli); **9)** LPS *P. gingivalis* 33277; **10)** LPS *E. corrodens*. En todos los pozos se sembró 6  $\mu$ g de muestra.

**Tabla 2.** Identificación de LPS en extractos purificados de *P. gingivalis* W83 y *E. corrodens* 23834 por el ensayo Purpald.

Muestra	Concentración de la muestra (mg/mL)	Concentración relativa (mM)*	Correlación (R <sup>2</sup> ) concentración KDO vs Absorbancia
LPS <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 7823	0.5	0,407	0,998
LPS <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATTC 33277 InvivoGen	0.5	0,054	
LPS <i>Rhodobacter sphaeroides</i> DSM 158 InvivoGen	0.5	0,050	
LPS <i>Escherichia coli</i> 0111:B4 InvivoGen	0.5	0,012	
LPS <i>Escherichia coli</i> 0127:B8 Sigma	0.23	0,025	
Extracto purificado <i>Porphyromonas gingivalis</i> W83	0.01	0,553	
Extracto purificado <i>E. corrodens</i> 23834	0.01	0,066	

\* Los valores de concentración milimolar relativa para cada lipopolisacárido fueron calculados a partir de una curva de calibración de KDO de concentración conocida.

Hasta el momento no se ha determinado a nivel molecular y estructural la región nuclear del LPS para *P. gingivalis* W83 y *E. corrodens* 23834. Sin embargo, se ha identificado por espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (GC-MS), la presencia de KDO en LPS de *P. gingivalis* y en algunas cepas como W50, la ausencia de heptosas en la región nuclear, con LPS que presentan un quimiotipo liso (Kumada *et al.*, 1993; Paramonov *et al.*, 2009; Rangarajan *et al.*). La presencia de KDO y heptosas presentes en LPS de *E. corrodens* 23834 fue identificada en baja concentración en estudios previos por el método ácido tiobarbitúrico y

de Wright (Progulske and Holt, 1984). Esos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio con el ensayo Purpald.

Por último se determinó la capacidad endotóxica de los lipopolisacáridos purificados de *E. corrodens* y *P. gingivalis* por la técnica cromogénica del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL; Pyrocrome., Cape Code. USA). Esta técnica es la más sensible y específica para la cuantificación de endotoxinas (Ide *et al.*, 2004; Lindsay *et al.*, 1989; Pussinen *et al.*, 2007). Se observa que los LPS purificados de *P. gingivalis* W83 y *E. corrodens* 23834 tienen una mayor actividad endotóxica a

**Tabla 3.** Actividad endotóxica de purificados de LPS por LAL cromogénico (Pyrochrome®)

Muestra	concentración	Concentración relativa de Endotoxina (U.E/mL)	Correlación curva LPS CSE vs Absorbancia
LPS <i>E. corrodens</i> 23834	50 ng/mL	0,18	R <sup>2</sup> = 0997
LPS <i>P. gingivalis</i> W83	10 ng/mL	0,175	
LPS <i>P. gingivalis</i> 33277	0,5 µg/mL	0.26	
LPS <i>E. coli</i> (Sigma)	50 ng/mL	0,16	
LPS <i>S. typhimurium</i> (Sigma)	50 ng/mL	N.D	

Lote kit: PP1182. Sensibilidad 0,005 U.E/mL

bajas concentraciones, similar a las observadas por el LPS de *E. coli* (tabla 3). Mientras que, el LPS de *P. gingivalis* 33277 a elevadas concentraciones no presenta buena reactividad con este test. Sin embargo, deberá aumentarse el tamaño de muestras de la prueba para confirmar estos resultados estadísticamente.

En el caso del LPS de *S. typhimurium* la actividad no fue determinada debido a que la reacción estaba por encima del límite superior de la curva del control estándar de endotoxina, lo que sugiere una mayor potencia endotóxica para este LPS. Aunque se ha reportado que la actividad endotóxica para algunos LPS no es reflejada en el ensayo LAL (Dehus *et al.*, 2006), estos resultados sugieren que los LPS purificados a partir de *E. corrodens* y *P. gingivalis* son endotoxinas y presentan actividad biológica.

## Conclusiones

La metodología implementada en este estudio, utilizando diferentes técnicas previamente reportadas para la extracción, purificación y caracterización de LPS, permitió la obtención de LPS de elevada pureza a partir de cultivos de bacteria completa de *P. gingivalis* W83 y *E. corrodens* 23834. La caracterización bioquímica de los extractos purificados determinó la presencia de LPS-S para la cepa 23834 de *E. corrodens* y de LPS-SR para la cepa W83 de *P. gingivalis*. Ambos LPS purificados fueron positivos para KDO y presentaron actividad endotóxica.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado para la purificación de LPS de *E. corrodens* 23834 por la Fundación para la promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República (proyecto 2,706). Además fue financiado para la purificación de LPS de *P. gingivalis* W83 por el Departamento Administrativo de Ciencia Tecnología e Innovación COLCIENCIAS (proyecto: 130851928960). Queremos también agradecer a la División de Investigaciones de la Universidad El Bosque por la financiación y gestión administrativa para la ejecución de estos proyectos.

A la memoria del profesor Gerardo Pérez del laboratorio de Bioquímica, Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, por sus asesorías en la purificación por cromatografía del extracto de *E. corrodens*.

## Conflicto de interés

Los autores expresamos que no existe ningún conflicto de interés en la publicación de este estudio.

## Referencias bibliográficas

Apicella, M.A. 2008. Isolation and characterization of lipopolysaccharides. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 431, pp. 3-13.

Chen, C. K., Wilson, M.E. 1990. Outer membrane protein and lipopolysaccharide heterogeneity among *Eikenella corrodens* isolates. *The Journal of Infectious Diseases*. 162(3): 664-671.

Curtis, M.A., Slaney, J.M., Aduse-Opuko, J. 2005. Critical pathways in microbial virulence. *Journal of clinical periodontology*. 32(6): 28-38.

Darveau, R.P., Hancock, R.E. 1983. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *Journal of Bacteriology*. 155(2): 831-838.

Dehus, O., Hartung, T., Hermann, C. 2006. Endotoxin evaluation of eleven lipopolysaccharides by whole blood assay does not always correlate with limulus amebocyte lysate assay. *Journal of Endotoxin Research*. 12(3): 171-180.

Elkaim, R., Dahan, M., Kocgozlu, L., Werner, S., Kanter, D., Kretz, J.G., and Tenenbaum, H. 2008. Prevalence of periodontal pathogens in subgingival lesions, atherosclerotic plaques and healthy blood vessels: A preliminary study. *Journal of Periodontal Research*. 43(2): 224-231.

Galanos, C., Lüderitz, O., Westphal, O. 1969. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *European Journal of Biochemistry*. 9(2): 245-249.

Gualtero, D., Castellanos, J.E., Pérez, G., Lafaurie, G.I. 2008. Purificación de lipopolisacáridos de *Porphyromonas gingivalis* libre de polisacáridos utilizando cromatografía de alta resolución Sephacryl S-200. *Acta Biológica Colombiana*. 13(3): 147-160.

Hirschfeld, M., Ma, Y., Weis, J.H., Vogel, S.N., and Weis, J.J. 2000. Cutting edge: Repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *Journal of Immunology*. 165(2): 618-622.

Hitchcock, P.J., Brown, T.M. 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Bacteriology*. 154(1): 269-277.

Ide, M., Jagdev, D., Coward, P.Y., Crook, M., Barclay, G.R., and Wilson, R.F. 2004. The short-term effects of treatment of chronic periodontitis on circulating levels of endotoxin, C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6. *Journal of Periodontology*. 75(3): 420-428.

Jaramillo, R., Suárez, P., Barraza, B., Lara, P., Teherán, L., Escamilla, J. 2006. *Eikenella corrodens*: Pathogenesis and clinic aspects. *Colombia Médica*. 37(3): 228-241.

Kallio, K.A., Buhlin, K., Jauhiainen, M., Keva, R., Tuomainen, A.M., Klinge, B., Pussinen, P.J. 2008. Lipopolysaccharide associates with pro-atherogenic lipoproteins in periodontitis patients. *Innate Immunity*. 14(4): 247-253.

Kebschull, M., Demmer, R.T., Papapanou, P.N. 2010. "Gum bug, leave my heart alone!"—epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *Journal of Dental Research*. 89(9): 879-902.

Kumada, H., Kondo, S., Umemoto, T., & Hisatsune, K. 1993. Chemical structure of the 2-keto-3-deoxyoctonate region of lipopolysaccharide isolated from *Porphyromonas* (bacteroides) *gingivalis*. *FEMS Microbiology Letters*. 108(1): 75-79.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259): 680-685.

Lafaurie, G.I., Mayorga-Fayad, I., Torres, M.F., Castillo, D.M., Aya, M.R., Baron, A., and Hurtado, P.A. 2007. Periodontopathic microorganisms in peripheral blood after scaling and root planing. *Journal of Clinical Periodontology*. 34(10): 873-879.

Lamont, R.J., Jenkinson, H.F., 1998. Life below the gum line: Pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: MMBR, 62(4): 1244-1263.

Lee, C.H., Tsai, C.M., 1999. Quantification of bacterial lipopolysaccharides by the Purpald assay: Measuring formaldehyde generated from 2-keto-3-deoxyoctonate and heptose at the inner core by periodate oxidation. *Analytical Biochemistry*. 267(1): 161-168.

- Lin, M.F., Williams, C., Murray, M.V., and Ropp, P.A. 2005. Removal of lipopolysaccharides from protein-lipopolysaccharide complexes by nonflammable solvents. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 816(1-2): 167-174.
- Lindsay, G.K., Roslansky, P.F., Novitsky, T.J. 1989. Single-step, chromogenic limulus amebocyte lysate assay for endotoxin. *Journal of Clinical Microbiology*. 27(5): 947-951.
- Manthey, C.L., Vogel, S.N. 1994. Elimination of trace endotoxin protein from rough chemotype LPS. *Journal of Endotoxin Research*. 1(2): 84-91.
- Marchesan, J.T., Morelli, T., Lundy, S.K., Jiao, Y., Lim, S., Inohara, N., Giannobile, W.V. 2012. Divergence of the systemic immune response following oral infection with distinct strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Molecular Oral Microbiology*. 27(6): 483-495.
- Matsuura, M. 2013. Structural modifications of bacterial lipopolysaccharide that facilitate Gram-negative bacteria evasion of host innate immunity. *Frontiers in immunology*. 4: 109.
- Mayorga-Fayad, I., Lafaurie, G.I., Contreras, A., Castillo, D.M., Baron, A., and Aya Mdel, R. 2007. Subgingival microbiota in chronic and aggressive periodontitis in Bogotá, Colombia: An epidemiological approach. [Microflora subgingival en periodontitis crónica y agresiva en Bogotá, Colombia: un acercamiento epidemiológico]. *Biomedica: Revista Del Instituto Nacional De Salud*. 27(1): 21-33.
- Morrison, D.C., Leive, L. 1975. Fractions of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O111:B4 prepared by two extraction procedures. *The Journal of Biological Chemistry*. 250(8): 2911-2919.
- Padilla, E.C., Lobos, G.O., Jure, O.G., Matus, F.S., Descouvieres, C.C., Hasbun, A.S., Nunez, F.L. 2007. Isolation of periodontal bacteria from blood samples and atheromas in patients with atherosclerosis and periodontitis. [Aislamiento de bacterias periodontopáticas desde hemocultivos y ateromas obtenidos de pacientes con aterosclerosis y periodontitis] *Revista Médica De Chile*. 135(9): 1118-1124.
- Paramonov, N.A., Aduse-Opoku, J., Hashim, A., Rangarajan, M., Curtis, M.A. 2009. Structural analysis of the core region of O-lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* from mutants defective in O-antigen ligase and O-antigen polymerase. *Journal of Bacteriology*. 191(16): 5272-5282.
- Perdomo R., Montero, V. 2006. Purificación de lipopolisacáridos de *E. coli* 055:B5 por cromatografía de exclusión molecular. *Biotecnología Aplicada*. 23:117-123.
- Posch, G., Andrukhov, O., Vinogradov, E., Lidner, B., Messner, P., Holst, O. and Schaffer, C., 2013. Structure and immunogenicity of the rough-type lipopolysaccharide from the periodontal pathogen *Tannerella forsythia*. *Clinical and vaccine immunology: CVI*. 20(6): 945-953.
- Progulske, A., Holt, S.C. 1984. Isolation and characterization of the outer membrane and lipopolysaccharide from *Eikenella Corrodens*. *Infection and Immunity*. 43(1): 166-177.
- Pussinen, P.J., Tuomisto, K., Jousilahti, P., Havulinna, A.S., Sundvall, J., and Salomaa, V., 2007. Endotoxemia, immune response to periodontal pathogens, and systemic inflammation associate with incident cardiovascular disease events. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 27(6): 1433-1439.
- Raetz, C.R. and Whitfield, C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*. 71:635-700.
- Rangarajan, M., Aduse-Opoku, J., Paramonov, N., Hashim, A., Bos-tanci, N., Fraser, O.P., Curtis, M.A. 2008. Identification of a second lipopolysaccharide in *Porphyromonas gingivalis* W50. *Journal of Bacteriology*. 190(8): 2920-2932.
- Reddi, K., Poole, S., Nair, S., Meghji, S., Henderson, B., and Wilson, M. 1995. Lipid A-associated proteins from periodontopathogenic bacteria induce interleukin-6 production by human gingival fibroblasts and monocytes. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 11(2): 137-144.
- Rybka, J., Grycko, P., Francisco, J.D.C., Gamian, A. and Dey, E.S. 2008. Application of supercritical carbon dioxide (scCO<sub>2</sub>) for the extraction of lipopolysaccharides (LPS) from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* PCM 2266. *The Journal of Supercritical Fluids*. 45(1): 51-56.
- Shands, J.W., Jr, Chun, P.W. 1980. The dispersion of gram-negative lipopolysaccharide by deoxycholate. Subunit molecular weight. *The Journal of Biological Chemistry*. 255(3): 1221-1226.
- Sismey-Durrant, H.J., Hopps, R.M. 1991. Effect of lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* on prostaglandin E2 and interleukin-1-beta release from rat periosteal and human gingival fibroblasts *in vitro*. *Oral Microbiology and Immunology*. 6(6): 378-380.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 150(1): 76-85.
- Thomopoulos, C., Tsioufis, C., Soldatos, N., Kasiakogias, A., and Stefanadis, C. 2011. Periodontitis and coronary artery disease: A questioned association between periodontal and vascular plaques. *American Journal of Cardiovascular Disease*. 1(1): 76-83.
- Tirsoaga, A., Novikov, A., Adib-Conquy, M., Werts, C., Fitting, C., Ca-vaillon, J.M., Caroff, M. 2007. Simple method for repurification of endotoxins for biological use. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(6): 1803-1808.
- Tsai, C.M., Frasch, C.E. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 119(1): 115-119.
- Wang, X., Zhang, C., Shi, F., Hu, X., 2010. Purification and characterization of lipopolysaccharides. *Sub-Cellular Biochemistry*. 53: 27-51.
- Wetsphal O, Jann K. 1965. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further application of the procedure. in: In New York: Academic Press (Ed.), *Methods in carbohydrate chemistry*. pp. 83-91
- Wiedermann, C.J., Kiechl, S., Dunzendorfer, S., Schratzberger, P., Egger, G., Oberhollenzer, F., Willeit, J., 1999. Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease: Prospective results from the bruneck study. *Journal of the American College of Cardiology*. 34(7): 1975-1981.
- Wu, L.H., Tsai, C.M., Frasch, C.E. 1987. A method for purification of bacterial R-type lipopolysaccharides (lipooligosaccharides). *Analytical Biochemistry*. 160(2): 281-289.
- Yi, E.C., Hackett, M. 2000. Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram-negative bacteria. *The Analyst*. 125(4): 651-656.



# Evaluación *in vivo* del efecto cicatrizante de un gel a base de quitosano obtenido de exoesqueleto de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

## Healing effect of a chitosan-based gel obtained from the exoskeleton of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its evaluation *in vivo*

Heimy Franceline Martínez Sánchez\*, Amada Yerén Escobedo Lozano\*\*, Evaristo Méndez-Gómez\*\*\*, Alfredo Emmanuel Vázquez\*\*\*\*, Manuel de Jesús Sol Hernández\*\*\*\*\*, Anahí Elizabeth Osuna Lizárraga\*\*\*\*\*

### Resumen

En México alrededor del 62 % de la población sufre de accidentes causantes de alteraciones en la piel como quemaduras, heridas y diabetes principalmente. Para atender esta problemática, se propone el uso de un gel de quitosano, obtenido del exoesqueleto de camarón ya que presenta actividad antimicrobiana e inmunológica acelerando la cicatrización. Se evaluó el efecto sinérgico sobre la velocidad de cicatrización, aplicándolo en heridas de 1 cm<sup>2</sup> infringidas a 48 ratones albinos, agrupados en cuatro tratamientos; Quitosano 0.15 y 0.30 %, producto cicatrizante (Ketanserina al 2 %) y blanco (testigos sin tratamiento). El tiempo para la cicatrización sin tratamiento y el producto comercial fue 14 días, teniendo el control un efecto cicatrizante del 0 %, mientras que los geles de quitosano 0.15 y 0.30 % cicatrizaron en 7 días ( $P > 0.05$ ) con efecto cicatrizante del 58 % para el quitosano 0.15 y 64 % para el quitosano 0.30.

**Palabras clave:** piel, heridas, gel, quitosano, cicatrización.

### Abstract

Skin problems in Mexico have steadily increased (62 %) by burns, wounds and diabetes mainly. To solve this problem, chitosan can be implemented; this polysaccharide has an antimicrobial and immunology activity against bacteria and fungi, accelerating healing. Therefore, synergistic effect of chitosan gel on the rate of healing, obtained from the exoskeleton of shrimp, that was evaluated. This was tested by applying it 1 cm<sup>2</sup> of inflicted wounds of 48 albino mice, of 45 days old and between 23 to 26 g of weight, during 14 days, and grouped into four treatments: 1) 0.15 % chitosan 2) 0.30 % chitosan, 3) commercial product 2 % Ketanserine and 4) A batch of untreated controls. The time required for healing without treatment was 14 days and with the utilization of 0.30 % chitosan gel was achieved in 7 days ( $P > 0.05$ ) with the healing effect 58 % for the chitosan 0.15 and 64 % for chitosan 0.30.

**Key words:** skin, wounds, gel, chitosan, healing.

**Recibido:** octubre 15 de 2013

**Aprobado:** abril 15 de 2014

\* M.C., Departamento de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Mazatlán, Mazatlán Sinaloa, México.

\*\* Ph.D., Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Mazatlán, Mazatlán Sinaloa, México. amada1.ayel@gmail.com

\*\*\* Ph.D., Departamento de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Mazatlán, Mazatlán Sinaloa, México.

\*\*\*\* M. en I., Departamento de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Mazatlán, Mazatlán Sinaloa, México.

\*\*\*\*\* M.C., Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Mazatlán, Mazatlán Sinaloa, México.

\*\*\*\*\* M.C., Departamento de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Mazatlán, Mazatlán Sinaloa, México.

## Introducción

Estudios realizados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía, señalan que la incidencia de problemas en la piel ocasionados por heridas y quemaduras en México se ha incrementado en el 2009, ya que el 62 % de la población había sufrido alteraciones en la piel (INEGI, 2009), además el 14 % de la población mexicana presenta trastornos en la piel ocasionadas por la diabetes. Al respecto, México se encuentra en el séptimo lugar a nivel mundial con problemas de diabetes (FMD, 2010). , presentándose en los afectados problemas de cicatrización, con engrosamiento y endurecimiento en la piel, los cuales pudieran ser estudiados mediante la aplicación de quitosano (poli  $\beta$ -N-acetil-glucosamina-co- $\beta$ -glucosamina) por vía tópica, gel o mezclado con otras sustancias, sin añadir antibióticos, ya que se ha descrito actividad antimicrobiana e inmunológica del quitosano frente a bacterias y hongos (Khan et al., 2002).

México tiene una gran fuente para la extracción de quitina y obtención de quitosano, debido a su elevada productividad camaronera, destacándose la acuicultura de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, la cual representa el 70 % de la producción anual total (CONAPESCA, 2010). Cabe aclarar que ninguna investigación específica el uso de quitina extraída de esta especie de camarón utilizada para la elaboración de un gel de quitosano como se propone en esta investigación, aunque su uso como cicatrizante se ha propuesto (Baltodano et al., 2007; García et al., 2008). Existen geles cicatrizantes a base Hialuronato de zinc y Ketanserina elaborados con sustancias químicas (Salazar et al., 2000), haciéndolos toxigénicos con mínima biocompatibilidad y biodegradabilidad nula, también existen ungüentos de quitosano obtenido de caparazón de cangrejo presentando menor toxicidad (Baltodano et al., 2007).

Por otro lado, el procesamiento del camarón en este país genera desechos que alcanzan un 30 % de la producción, esto indica la falta de aprovechamiento de biomoléculas de alta demanda mundial como la quitina, que puede ser transformada en quitosano teniendo diversas aplicaciones en agricultura, ganadería, industria (Lárez, 2003), cosméticos y biomedicina (Tapia et al., 2009), requiriéndose la refinación del mismo para que adquiera grado farmacéutico y emplearlo en la curación de heridas, ya que la cicatrización conduce a la distorsión del tejido cicatrizante y daños morfofuncionales, ocasionados por la formación de tejido conectivo con disposición desordenada de apariencia fibrosa (Khalam et al., 2003).

Por las razones anteriores, se propone evaluar *in vivo* el efecto cicatrizante de un gel de quitosano obtenido de exoesqueleto de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, que ayude a la reconstrucción estructural adecuada de la piel (Feedar, 1995). Para ello, los lisosomas (órganulos encargados de la digestión celular de bacterias y agentes externos) son activados por las

células dañadas (células animales) y estimulados por el quitosano cuando éste se encuentra en contacto con la herida (Rhoades y Roller, 2000). La estimulación de los lisosomas ocurre por la presencia de tres grupos acetilos consecutivos localizados en la estructura del quitosano, permitiendo la identificación y degradación del mismo formando oligómeros que exponen el grupo amino y acetilo que actúan como antisépticos (Rabea et al., 2003). Al ser activados los lisosomas por el quitosano, se induce la activación de los glicosaminoglicanos (GAG), los cuales se encuentran unidos a proteoglicanos formando proteínas de adhesión y encargados de la formación de fibrillas y enlaces con el colágeno de forma ordenada (Yadav y Bhise, 2009).

Por otro lado, la importancia de elaborar este gel radica en la utilización de los desechos de esta especie, contribuyendo en la disminución del problema de contaminación que causa y a su vez elaborar un producto tecnológico con aplicación biomédica, realizando una evaluación *in vivo* del efecto cicatrizante y comparándolo con un blanco (testigo sin tratamiento) y un control (producto comercial).

## Materiales y métodos

El exoesqueleto de camarón blanco fue sometido a un tratamiento químico en tres etapas: desmineralización con ácido clorhídrico (HCl) a 37 °C, desproteinización con hidróxido de sodio (NaOH) a 50-60 °C para obtener quitina, la cual se caracterizó de acuerdo a los parámetros establecidos por Sahidí y Gamage en el 2007. La desacetilación se realizó empleando NaOH al 50 % para obtener el quitosano con relación p/p 1:10a 37 °C por tres horas. Para obtener quitosano grado farmacéutico, se purificó aplicando disolución y sistema de filtrado auxiliado con bomba de vacío, enseguida se centrifugó a una velocidad de 8000 rpm durante 15 minutos a 29 °C.

La calidad del quitosano (grado farmacéutico ó grado industrial) se determinó evaluando contenido de cenizas en base a la técnica establecida en la NMX-F-083-1986, porcentaje de humedad en base a la técnica establecida en la NMX-F-066-S-1978, porcentaje de grasas y aceites por la técnica de la NMX-AA-005-SCFI-2000, porcentaje de nitrógeno por la técnica establecida por la NMX-068-S-1980. El grado de desacetilación fue evaluado con el método de valoración potenciométrica (Baltodano et al., 2007) y el peso molecular se determinó por el método viscosimétrico (Pastor, 2004).

Caracterizado el quitosano, se elaboró el gel agregando agua tibia (30 °C) en el recipiente de la agitadora; enseguida se incorporaron carbopol 50 % p/p, trietanolamina 40 % p/p (Abdullah et al., 2011; Karavana et al., 2012) y alcohol 9,7 % p/p con agitación constante a 300 rpm durante 15 min hasta lograr una mezcla homogénea. Luego se agregó el quitosano (ingrediente activo) en concentraciones de 0,15 % y 0,30 % (p/p). Una vez obtenidas las diversas concentraciones, se en-

vasaron en frascos de polietileno de 100 g previamente esterilizados (García y Roca., 2008).

Evaluación experimental *in vivo* del gel a base de quitosano

- Se realizaron 4 tratamientos por triplicado del Gel Q 0.30 (gel al 0.30 %), Gel Q 0.15 (gel al 0.15 %), blanco (sin tratamiento) y un control (tratados con producto comercial cicatrizante a base de Ketanserina al 2 %). En cada grupo experimental se trabajó con 12 animales, 6 hembras y 6 machos, colocados en jaulas individuales.
- Se utilizaron jaulas individuales de acero, con dimensiones de 15 x 12 x 12 cm, con sistema de limpieza y desinfección en base a la "Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: "ratón" (Fuentes *et al.*, 2008).
- Manejo de los ratones. Se alimentaron diariamente con pellets previamente esterilizados en autoclave y se cuidaron durante una semana sin tratamiento alguno para lograr su adaptación al sitio experimental, verificando el cumplimiento del peso necesario para el estudio. Después se depilaron con crema en el primer tercio dorsal anterior en un área de 1 cm<sup>2</sup>. Posterior a la depilación, los ratones se colocaron en sus respectivas jaulas individuales, teniendo libre acceso a bebida y comida (Fuentes *et al.*, 2008).
- Incisión. Después de 24 horas de la depilación, el ratón fue colocado sobre la mesa de trabajo, desinfectando el área depilada y marcando el área de corte longitudinal utilizando una plantilla de plástico de 2 x 0.5 cm para lograr una herida de 1cm<sup>2</sup>. Se resecó la piel con la aplicación de alcohol etílico al 85 %, retirando la primera capa de la piel hasta dejar expuesta la fascia, sin lesionarla (Baltodano *et al.*, 2007).
- Tratamiento. Para el grupo del Control se cubrió la herida con un tratamiento alterno constituido por una base gelificada con Ketanserina al 2 % como ingrediente activo; el grupo del Gel Q 0.15 fue tratado con gel con quitosano 0.15 %, el grupo Gel Q 0.30 se cubrió con gel con quitosano 0.30 % y ambos fueron cubiertos con un apósito limpio asegurando el contacto con la superficie de la herida, al grupo Blanco no se le aplicó nada en la herida. La curación se realizó cada 24 horas, renovando la aplicación de los geles y el apósito.
- Medición de variable directa. Las variables directas a evaluar para cada uno de los tratamientos fueron: Cicatrización y Peso. La cicatrización se valoró mediante la comparación de la evolución del área de crecimiento de tejido, la cual fue fotografiada inmediatamente después de realizar la herida, a las 24, 48 y 72 horas, 7 y 14 días después, para calcular el porcentaje de efecto cicatrizante

se aplicó la siguiente fórmula (Baltodano *et al.*, 2007):

$$\frac{(\text{Tiempo de cicatrización blanco} - \text{Tiempo cicatrización}) * 100}{\text{Tiempo cicatrización blanco}}$$

Para cada uno de los tratamientos se les realizó la prueba de normalidad de Shapiro y homoscedasticidad de Bartlett por género. El tejido cicatrizado fue analizado mediante un Análisis de varianza de dos vías (ANOVA) (P<0.05). Al final del estudio se comparó el peso promedio de machos y hembras mediante la prueba T de Student de varianzas iguales (P<0.05) (Baltodano *et al.*, 2007).

## Resultados

### a) Elaboración del gel a base de quitosano

La quitina obtenida fue de color amarillento, con textura sólida, soluble en ácidos inorgánicos y orgánicos, e insoluble en agua, por lo que pudo ser transformada a quitosano obteniendo un rendimiento del 31 % el cual fue sometido a una técnica de purificación establecida por Pastor en el 2008. Una vez purificado se obtuvo un rendimiento de quitosano grado farmacéutico del 20.55 %. En cuanto al diseño de la forma farmacéutica se obtuvo un gel a base de quitosano semisólido grado farmacéutico. Los parámetros evaluados en la caracterización del quitosano grado farmacéutico se encontraron dentro del rango sugerido por Khan y colaboradores en el año 2002 (tabla 1).

**Tabla 1.** Comparación de las características del quitosano obtenido con un quitosano comercial.

Parámetro %	Quitosano producido en esta investigación	Quitosano Grado farmacéutico (Khan <i>et al.</i> , 2002)
Cenizas	0.51	0.60
Humedad	2.73	11.58
Nitrógeno	6.23	6-8.4
Desacetilación	76.45	79
Peso molecular gr/mol	1.5 x10 <sup>5</sup>	1-3x10 <sup>5</sup>
Grasas y aceites g/Kg	0.8	—

### b) Evaluación experimental

El análisis de comparación entre los pesos de hembras y machos no mostró diferencias significativas (p>0.05) para los tiempos 1, 7 y 14 días (tabla 2).

El análisis de varianza realizado en los cuatro tratamientos aplicados en ratones hembras dio como re-

sultado diferencias significativas ( $p>0.05$ ) al 4to entre el tratamiento Gel 0.30 respecto al control y blanco, para el séptimo día resultaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre el gel de quitosano en ambas concentraciones respecto a los tratamientos blanco y control, presentando el 100 % de tejido cicatrizado en menor tiempo el gel de quitosano en ambas concentraciones.

El análisis de varianza realizado en los cuatro tratamientos aplicados en ratones machos dio como resultado diferencias significativas ( $p>0.05$ ) para el cuarto día entre el gel de quitosano 0.30 % respecto al blanco y control, mientras que el gel de quitosano 0.15 % presentó diferencias significativas ( $p>0.05$ ) respecto al control, para el séptimo día resultaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre el gel de quitosano en ambas concentraciones respecto al control y blanco.

El porcentaje de cicatrización promedio de hembras y machos observado en esta investigación, fue analizado estadísticamente para determinar las diferencias empleando la prueba T de Student de varianzas iguales, los resultados señalaron que no existieron diferencias significativas ( $p<0.05$ ) en las cicatrizaciones (Resultados no mostrados).

La valoración del porcentaje de cicatrización de los tratamientos ensayados empleando la fórmula propuesta por Gutiérrez y colaboradores en el 2005, se obtuvo que con el tratamiento correspondiente al gel de quitosano aplicado al 0.30 % y empleando la fórmula que relaciona área cicatrizada con el tiempo y lo compara con el testigo sin tratamiento, se obtuvo un porcentaje de efecto cicatrizante del 64 % seguido del gel de quitosano al 0.15 % con efecto de cicatrización del 58 % ya que cicatrizaron la herida en un 100 % al día 7; mientras que el control tuvo un efecto de cicatrización de 0 ya que cicatrizó hasta el final del tratamiento (día 14) al igual que el blanco.

**Declaración conflicto e intereses:** Los autores declararon no tener conflictos de intereses.

## Discusión

### a) Obtención de quitosano grado farmacéutico

La transformación de quitina a quitosano obtenida en este estudio, cumplió con los parámetros de color, tex-

tura y solubilidad sugeridos por Shaidí y Gamage en el 2007, quienes establecieron que el color debe de estar entre blanco a blanco-amarillento, la textura debe de ser sólida y debe de ser soluble en ácidos orgánicos e insoluble en agua.

La despolimerización de la quitina a quitosano obtenido a partir del exoesqueleto del camarón, arrojó un rendimiento del 31 %, el cual se encuentra por encima del máximo rendimiento reportado por Hernández en el 2009 (especie no especificada), quién obtuvo un 30 % de rendimiento (peso/peso).

El rendimiento de quitosano grado farmacéutico obtenido en esta investigación fue 20.55 %, superior al rendimiento reportado por J. Gacén e I. Gacén en 1996, quién señaló haber obtenido solo el 10 %. El quitosano obtenido en esta investigación reportó un contenido bajo de grasas de 0.8 g/Kg nivel que no interfiere en el proceso de cicatrización y por ello permite que el quitosano sea utilizado en la curación de heridas. El contenido de grasas y aceites en las terapias para la curación de las heridas en la piel, debe de aplicarse en cantidades pequeñas ya que puede obstruir el proceso de cicatrización (Alfonso, 2001).

Los porcentajes de ceniza, humedad y nitrógeno contenidos en el quitosano obtenido en esta investigación, fueron menores a los valores reportados por la empresa (Khodaverdi *et al.*, 2012), lo cual demuestra que se encuentra dentro de los parámetros estándares establecidos por esta empresa (tabla 2). El parámetro denominado Contenido de Cenizas es determinado por la presencia de carbonatos ( $\text{CaCO}_3$ ), abundantes en el exoesqueleto de los crustáceos, sin embargo, el nivel encontrado en esta investigación fue bajo ya que los minerales son retenidos en la etapa de desacetilación (Guinama, 2010). J. Gacén e I. Gacén en 1996, sugirieron para el quitosano un porcentaje de humedad entre el 2 al 10 % ya que permite una mejor manipulación del quitosano y su almacenamiento. En esta investigación se registró un 2.73 % de humedad, encontrándose este parámetro dentro del rango. El porcentaje de nitrógeno registrado de 6.23 %, se registró dentro del rango sugerido por Khan y colaboradores en el 2002; así como Khodaverdi y colaboradores en el año 2012 (6-8 %), para el quitosano grado farmacéutico. La pre-

**Tabla 2.** Peso promedio y desviación estándar de ratones albinos hembras y machos.

Muestra (g)	Tiempo (días)					
	0		7		14	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Blanco	24.72 ± 1.21	24.78 ± 1.22	24.7 ± 1.64	24.92 ± 1.70	25.35 ± 1.93	25.31 ± 1.74
Control	24.74 ± 1.32	25.55 ± 1.14	24.72 ± 1.67	25.02 ± 1.60	25.27 ± 1.65	25.55 ± 1.68
Gel A 0.15	23.47 ± 0.46	24.28 ± 1.11	23.51 ± 1.22	24.33 ± 0.74	24.22 ± 1.34	24.84 ± 0.88
Gel A 0.30	23.53 ± 0.64	24.93 ± 0.91	23.51 ± 0.98	25.01 ± 1.20	24.05 ± 1.27	25.49 ± 1.16



sencia de grupos aminos y acetilos, desempeñan una función anfotérico y bacteriostática.

El grado de desacetilación del quitosano recomendado por Pastor (2004) lo establece entre el 60 al 90 %, ya que fuera de éste se degradaría lentamente en la herida, los acetilos liberados irritan, inflaman e incrementa el tiempo de cicatrización, pudiendo ocasionar severas complicaciones en las personas que presentan diabetes, además, deben de mantenerse un mínimo de tres unidades acetiladas consecutivas, ya que son importantes para que sea reconocido por las lisozimas y estas puedan degradarlo, facilitando la granulación y organización celular del tejido nuevo, formándose una cicatriz disminuida (Pastor, 2004). El grado de desacetilación del quitosano en este trabajo fue del 76 %.

El peso molecular obtenido para el quitosano fue de  $1.5 \times 10^5$  g/mol, encontrándose dentro del rango sugerido por Khan y colaboradores en el 2002  $1$  a  $3 \times 10^5$  g/mol (tabla 1). Para la preparación del gel a base de quitosano en concentraciones del 0.15 y 0.30 % se utilizó Carbopol al 50 % y Trietanolamina al 40 %, que mantiene el ingrediente activo en contacto con la piel, permite el transporte de oxígeno del exterior hacia el interior y funciona como un vendaje oclusivo (Khan *et al.*, 2002).

#### b) Evaluación experimental *in vivo* del gel a base de quitosano

El peso de los ratones hembras y machos al no presentar diferencias significativas indican que no estuvieron sometidos a estrés, presentaron buena alimentación y se les dio un manejo adecuado durante todo el tratamiento, así como también reflejan que no hay interferencia en pérdida o aumento de peso por acción de las hormonas.

Los tratamientos Gel Q 0.15 (GQ15) y Gel Q 0.30 (GQ30) aplicados en hembras alcanzaron el 100 % de la cicatrización el día 7, el control (C) alcanzó el 100 % de la cicatrización el día 14 y el blanco (B) al concluir el tiempo del experimento (14 días) tenía un 96.29 % de tejido cicatrizado, mostrando mayor velocidad de cicatrización el gel de quitosano en ambas concentraciones. El análisis de varianza aplicado a los resultados de cicatrización, mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) a partir del día 4 entre los cuatro tratamientos (GQ15, GQ30, C y B) observándose desde este día mayor efectividad en los geles de quitosano y alcanzando la regeneración completa del tejido en menor tiempo el Gel Q 0.30 en comparación del blanco control y el de quitosano al 0.15 %.

Los tratamientos Gel Q 0.15 y Gel Q 0.30 aplicados en los machos alcanzaron el 100% de tejido cicatrizado al día 7, el tratamiento blanco (B) cicatrizó el día 14 y el control (C) mostró un porcentaje de cicatrización del 97 %, al término del tratamiento. Los tratamientos Gel Q 0.15 y Gel Q 0.30 reportaron el mayor porcentaje de cicatrización desde el primer día. El análisis de

varianza mostró diferencias significativas para el día 4 entre el gel Q 0.30 respecto al blanco y el control; mientras que para el día 7 se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos Gel Q 0.15 y Gel Q 0.30 respecto a los tratamientos blanco y control, confirmando estadísticamente que el mayor porcentaje de cicatrización media lo presentó el tratamiento Gel Q 0.30.

Debido a que los tratamientos Gel Q 0.15, Gel Q 0.30, Control (C) y Blanco (B) no mostraron diferencias significativas entre hembras y machos, se obtuvieron para ambos sexos los mismos porcentajes de efecto de cicatrización mostrando mayor efectividad el Gel A 0.30 con el 100 % de tejido cicatrizado al día 7 del experimento (64 % efecto cicatrizante). Baltodano en 2007<sup>2</sup> reportó un 72 % de efecto cicatrizante, el cual es mayor que el obtenido en la presente investigación aun cuando empleó misma especie, edad y manejo experimental, estas diferencias se deben posiblemente a que ella obtuvo el quitosano a partir de cangrejo *cáncer cetosus* y lo aplicó en un ungüento de vaselina.

## Conclusiones

Bajo las condiciones experimentales aplicadas en este trabajo, se logró extraer quitosano de exoesqueletos de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) con un rendimiento del 31% del peso del exoesqueleto, lo que permite señalar que se logró una transformación eficiente. Se logró la desacetilación termoalcalina de la quitina en un 72.45%. Los resultados de porcentaje de cenizas, humedad, grasas y aceites, demuestran que la calidad del quitosano obtenido en este trabajo es aceptable para aplicaciones médicas o farmacéuticas. Se logró preparar gel a base de quitosano con calidad farmacéutica.

La evaluación realizada en ratones proporcionó un efecto cicatrizante del 0 % para el control, mientras que los geles de quitosano 0.15 y 0.30 % cicatrizaron en 7 días ( $P > 0.05$ ) con efecto cicatrizante del 58 % para el quitosano 0.15, y 64 % para el quitosano 0.30, respecto al tratamiento blanco. Resultando diferencias significativas entre los tratamientos blanco y control respecto al gel de quitosano en ambas concentraciones (0.15 y 0.30 %).

El género de sexo (macho ó hembra) no mostró diferencias significativas en las evaluaciones realizadas a 36 °C y 22 °C.

Los resultados anteriores nos permiten deducir que el gel de quitosano en ambas concentraciones pueden ser utilizados en la regeneración de heridas, reduciendo en un 50% el tiempo de cicatrización, sin embargo como no presentaron diferencias significativas en la regeneración de tejido, se puede recomendar el gel en concentraciones del 0.15%, debido a la menor cantidad de ingrediente activo, lo que puede reducir

los costos con la misma efectividad que la del gel al 0.30%.

## Agradecimientos

Agradezco al Instituto Tecnológico de Mazatlán por sus instalaciones para el desarrollo de esta investigación.

## Referencias bibliográficas

- Arce, A.; y Camilo, C. 2011. Caracterización de películas comestibles de quitosano y la afectación de las propiedades por aplicación de aceites esenciales; Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia. 30. (25)
- Baltodano L C., Yaipen J.; y Fuertes, C M. 2009. Obtención, caracterización y diseño de una forma farmacéutica semisólida (ungüento) a base de quitosano con efecto cicatrizante. *ECIPERU*. 2007. 6(8): 77-85.
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. "Anuario estadístico 2010". [Monografía en internet] México. CONAPESCA 2010. [Consultado 2012 marzo], Disponible en: <http://www.conapesca.sagarpa/>.
- Diario Oficial de la Federación con fecha. Norma Oficial Mexicana NOM-F066-S-1978 "Determinación de cenizas en alimentos". 3 de noviembre de 1978. México.
- Diario Oficial de la Federación Norma Mexicana NMX.068-S-1980. "Alimentos. Determinación de proteínas". 4 de agosto de 1980. México.
- Diario Oficial de la Federación. Norma Mexicana NMX-AA-005-SCFI-2000. "Determinación de grasas y aceites recuperables en aguas naturales, residuales y residuales tratadas método de prueba". 25 de marzo de 1980. México.
- Diario Oficial de la Federación. Norma Mexicana NMX-F-083-1986 "Alimentos; determinación de humedad en productos alimenticios". 14 de julio de 1986. México.
- Feedar J A. 1995 Wound healing alternative in management. Editorial F. A. Davis Company 2da. Edición. *Philadelphia*. 3-17.
- Fuentes F, Mendoza R., Rosales A.; y Cisneros R. 2008. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. 1ra. Edición. Perú.: 7-50.
- García T, Roca J. 2008. Industrialización de los crustáceos para la obtención de quitosano en ungüento con efecto cicatrizante. [Serie en internet] 2008 consultado 2012 abril 18; 24(11): [aprox. 3 pp]. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S181099932008000200004&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S181099932008000200004&lng=es&nrm=iso). ISSN 1810-9993. 24/11/2011.
- Gutiérrez M, Castañón C, Güitrón A.; y Vega A. 2005. Model for the quantitative evaluation of cicatrization. Pilot study with bee honey. *ProQuest Medical*. 27: 116-117.
- Hernández CH, Águila AE, Flores AO, Viveros NE.; y Cassellis R. 2009. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales*. 22: 57-60.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía [monografía en internet]. México. INEGI, 2009. [consultado 2012 marzo]. Disponible en: [www.inegi.org.mx/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/sociodemografico/mujeres-yhombres/2009/MyH\\_2009\\_1.pdf](http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/sociodemografico/mujeres-yhombres/2009/MyH_2009_1.pdf).
- Kalam A, Sermisintham N, Chandkrachang S.; y Frans, W.F. 2003. Chitosan membrane as a wound-healing dressing: Characterization and clinical application. *Journal Biomedical Materials*. 69: 216-222.
- Khan T, Peh K.; y Ch'ng H. 2002. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *Journal Pharmaceutical*. 3: 205-212.
- Khan, T.A., Peh, K.K. y Ch'ng, H.S. 2002. Reporting Degree Deacetylation Values of Chitosan: The Influence of Analytical Methods. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5(3): 205212.
- Khodaverdi, E., Tafaghodi, M., Ganji, F., Abnoos, K. y Naghizadeh, H. 2012. In Vitro Insulin Release from Thermosensitive Chitosan Hydrogel. *AAPS Pharmaceutical Science Technology*. 13(2):460-466.
- Krasnov MS, Rybakova EY, Tikhonov VE, Stretskii GM, Avdeenko OE, Shaikhaliev AI, Yamskova VP, Yamskov IA. 2012. Burn-healing effects of a composition containing chitosan gel and a blood serum bioregulator. *Bull Exp Biol Med*. 153(4):550-3.
- Lárez V. 2003. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 4: 21.
- Pastor A. 2004. Obtención de quitina y quitosano a partir de desechos de crustáceos. En: Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú: Proyecto CYTED IV: (19):29-312.
- Rabea E I, Badawy M, Stevens C, Smaghe G.; y Steurbaut W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Bio macromolecules*. 6:1457-1465.
- Rhoades J, Roller S. 2000. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Application Environment Microbiology*. 66: 80.
- Salazar J, León I, Serrano G, Torres M. 2000. Estudio comparativo entre ketanserina y dextranómero en el tratamiento de úlceras en enfermos de lepra. *Leprolología*. 3: 518-522.
- Secretaría de Gobernación. Federación Mexicana del Diabetes [monografía en internet]. México. FMD, 2010. [consultado 2012 marzo], disponible en: <http://www.dof.gob.mx/documentos/3868/Salud/Salud.htm>.
- Shahidi F, Gamage A. 2007. Use of chitosan for the removal of metal ion contaminants and proteins for water (Tesis). Environmental science program, department of biochemistry. Canadá: University of Newfoundland.
- Tapia P, Soto D, Vergara L, Alburquerque C, Maccioni A, Matamata, A. 2009. Efecto antifúngico de quitosán de alto peso molecular en cepas de *Candida sp* aisladas de muestras clínicas. *Revista Chilena de Infectología*. 26: 515-519.
- Valentine R, Athanasiadis T, Moratti S, Hanton L, Robinson S, Wormald PJ. 2010. The efficacy of a novel chitosan gel on hemostasis and wound healing after endoscopic sinus surgery. *Am J Rhinol Allergy*. 24(1):70-5.
- Yadav A. V., Bhise S. B. 2004. Chitosan: a potential biomaterial effective against typhoid. *Current Science*. 87: 1176-1178 p.

# Estimulación de cardenólidos en brotes de *Digitalis purpurea* L. cultivados *in vitro* mediante elicitores

## Stimulation of cardenolides production in *Digitalis purpurea* L. shoot cultures by elicitors addition

Naivy Lisbet Pérez-Alonso<sup>\* 1</sup>, Franklyn Arana Labrada<sup>\*\*2</sup>, Alina Capote Pérez<sup>\*\* 1</sup>, Anabel Pérez Pérez<sup>1\*\*\*</sup>, Rafael Sosa<sup>3\*\*</sup>, Angel Mollineda<sup>4\*\*\*</sup>, Elio Jiménez González<sup>5\*</sup>

### Resumen

*Digitalis purpurea* L. es una de las principales fuentes de cardenólidos tales como digoxina y digitoxina. Estos fármacos son ampliamente usados en la disfunción cardíaca y para regular las arritmias del corazón. El presente trabajo se realizó con el objetivo de estudiar el efecto de tres elicitores en el cultivo de brotes de *Digitalis purpurea* var. Roter Berggold para incrementar la producción *in vitro* de cardenólidos. La elicitación es una estrategia para incrementar la producción de biomasa y metabolitos secundarios en el cultivo *in vitro*. Los elicitores evaluados fueron ChitoPlant (0,001; 0,01; 0,1 g.L<sup>-1</sup>); SilioPlant (0,01; 0,1; 1,0 g.L<sup>-1</sup>) y Jasmonato de metilo (60, 80 y 100 µM), descritos por primera vez para el incremento de cardenólidos. Se demostró que la elicitación es una estrategia viable para el incremento de cardenólidos en brotes de *D. purpurea*. El ChitoPlant®, redujo la altura sin afectación en el resto de las variables morfológicas evaluadas. Además indujo un incremento significativo en el contenido de cardenólidos. El SilioPlant® (0,01 g.L<sup>-1</sup>) no provocó afectaciones en la biomasa e incrementó significativamente la síntesis de cardenólidos en los brotes en 3,6 y 6,9 veces el contenido de digoxina y digitoxina respectivamente. La elicitación con el jasmonato de metilo provocó una reducción de la biomasa. Los contenidos de digoxina y digitoxina se incrementaron ligera y significativamente con 80 y 100 µM de jasmonato de metilo respectivamente. El mejor resultado integral se obtuvo con 0,01 g.L<sup>-1</sup> de SilioPlant, el cual indujo la mayor producción neta de cardenólidos por frasco de cultivo (4,72 µg digoxina y 88,27 µg digitoxina).

**Palabras clave:** chitoplant, digitoxina, digoxina, jasmonato de metilo, silioplant.

### Abstract

*Digitalis purpurea* L. is one of the main sources of cardenolides such as digitoxin and digoxin. These drugs are widely used to strengthen cardiac diffusion and to regulate heart rhythm. The aim of this study was to evaluate the influence of three elicitors on shoots of *Digitalis purpurea* var. Roter Berggold in semisolid media in order to increase cardenolides biosynthesis. Elicitation is a strategy to increase biomass and secondary metabolites production on *in vitro* cultures. The elicitors evaluated were ChitoPlant (0,001; 0,01; 0,1 g.L<sup>-1</sup>); SilioPlant (0,01; 0,1; 1,0 g.L<sup>-1</sup>) and Methyl jasmonate (60, 80, 100 µM), which are reported here to induce cardenolide production for first time. Elicitation resulted an effective strategy to increase cardenolide production on *D. purpurea* shoot cultures. ChitoPlant induced a decrease in shoots length, but had no effect on the rest of morphological parameters evaluated. As well, ChitoPlant increased cardenolide content. SilioPlant (0,01 g.L<sup>-1</sup>) did not affect biomass production and at the same time, increased in 3,6-fold and 6,9-fold digoxin and digitoxin content respectively.

\* Doctor en Ciencias Agrícolas.

\*\* Master en Biotecnología vegetal.

\*\*\* Técnico especialista

<sup>1</sup> Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5,5, 54830 Santa Clara, Villa Clara, Cuba. E-mail: naivy@ibp.co.cu; alina@ibp.co.cu; anabel@ibp.co.cu

<sup>2</sup> Universidad de las Tunas "Vladimir Ilich Lenin", Ave. Carlos J. Finlay s/n, Reparto Buenavista 75200 Israel Santos, Las Tunas, Cuba. E-mail: franklynal@ult.edu.cu

<sup>3</sup> Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5,5, 54830 Santa Clara, Villa Clara, Cuba

<sup>4</sup> Centro de Investigaciones Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5,5, 54830 Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

<sup>5</sup> Doctor en Ciencias Agrícolas. University of Florida, Tropical Research & Education Center Institute of Food & Agricultural Sciences. 18905 SW 280th Street Homestead, FL 33031. E-mail: eliojimenez@ufl.edu

tively. Elicitation with Methyl jasmonate resulted in decreased biomass production. Digoxin and digitoxin content was slight and significantly increased by Methyl jasmonate 80 and 100  $\mu\text{M}$  respectively. The best integral result was reached with 0,01 g.L<sup>-1</sup> of SiliPlant, which induced the highest net yields per culture flask (4,72  $\mu\text{g}$  of digoxin and 88,27  $\mu\text{g}$  of digitoxin).

**Key words:** chitoplant, digitoxin, digoxin, methyl jasmonate, silioplant.

**Recibido:** octubre 24 de 2013

**Aprobado:** abril 15 de 2014

### Abreviaturas

6-BAP	6-Bencilaminopurina
ACN	Acetonitrilo
AIA	Ácido indol-3-acético
ChP	ChitoPlant®
gMF	Gramos de masa fresca
gMS	Gramos de masa seca
HPLC	Cromatografía Líquida Alta Resolución (del inglés <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> )
MJ	Jasmonato de metilo
MS	Sales inorgánicas propuestas por Murashige y Skoog (1962)
SiP	SiliPlant®

### Introducción

Las plantas son consideradas una fuente valiosa para la producción de compuestos de interés farmacéutico (Fischer *et al.*, 2007). Entre ellas se destacan las pertenecientes al género *Digitalis*, siendo *Digitalis purpurea* L. una de las dos únicas especies de interés económico de dicho género como fuente de cardenólidos (Sales *et al.*, 2011). Estos compuestos muestran propiedades farmacodinámicas similares pero la digitoxina y la digoxina son los más relevantes para la industria farmacéutica (Hornberger *et al.*, 2000). En medicina, estos compuestos son fármacos valiosos en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca (Piñol *et al.*, 2008), pero en los últimos años se han descrito también sus efectos en el control del cáncer de riñón, de próstata y leucemia (Lewis, 2009).

El cultivo de plantas es hasta el momento la única fuente comercial para la producción de cardenólidos (Kuate *et al.*, 2008), pues la síntesis química de estos compuestos no es económicamente viable.

La variación de las condiciones ambientales que ocurre durante el crecimiento de las plantas en el campo, provoca la fluctuación y heterogeneidad de las sustancias activas y su concentración en los extractos obtenidos a partir de ellas (Roca-Pérez *et al.*, 2004). Por las razones anteriormente expuestas, es prioritario el desarrollo de estrategias biotecnológicas, específicamente el cultivo de tejidos, para la producción de estos compuestos activos (Vanisree y Tsay, 2007).

En consecuencia, varios métodos de cultivo *in vitro* de *Digitalis* spp. han sido descritos en la literatura científica. Tal es el caso del cultivo de suspensiones celulares (Kreis *et al.*, 1986), cultivos embriogénicos (Lindemann y Luckner, 1997), cultivo de raíces (Yoshimatsu *et al.*, 1990) y cultivo de brotes (Erdei *et al.*, 1981; Hagimori *et al.*, 1983). Además, el cultivo *in vitro* ha brindado

una excelente oportunidad para el desarrollo de investigaciones bioquímicas encaminadas al conocimiento de las rutas que rigen la biosíntesis de los cardenólidos (Gavidia *et al.*, 2007).

No obstante, los bajos rendimientos de cardenólidos obtenidos en estas investigaciones han impedido su aplicación a escala comercial. En este sentido han sido ensayadas diversas alternativas con el objetivo de incrementar la producción de cardenólidos en el género *Digitalis*, tales como cambios en la composición nutricional de los medios de cultivo, la biotransformación, la adición de precursores y la modificación genética (Hagimori *et al.*, 1983; Saito *et al.*, 1990; Gurel *et al.*, 2010).

En el caso específico de *D. purpurea*, por su importancia en la industria farmacéutica, existe una demanda creciente de tecnologías de producción alternativas al cultivo en condiciones naturales. El cultivo *in vitro* de células y tejidos permitiría contar con sistemas de producción definidos, en condiciones controladas, así como obtener rendimientos constantes del metabolito de interés (Paek *et al.*, 2005; Vanisree y Tsay, 2007).

El empleo de elicitores bióticos y abióticos constituye una estrategia para estimular la síntesis de metabolitos secundarios de plantas cultivadas *in vitro* (Zhang y Memelink, 2009). La elicitación se ha descrito, mayormente, en el cultivo de suspensiones celulares, en cambio existen muy pocos ejemplos de su aplicación en brotes cultivados *in vitro* (Liu *et al.*, 2007; Orlita *et al.*, 2008; Coste *et al.*, 2011).

Hasta el momento, en la literatura consultada sólo existen dos precedentes del empleo de elicitores, ambas en *Digitalis lanata* Erhn (Ghanem *et al.*, 2010; Pérez-Alonso *et al.*, 2012). En su investigación, Ghanem *et al.* (2010) compararon el efecto de la adición de ácido salicílico, extracto de levadura y cloruro de cal-



cio en brotes de *Digitalis lanata* Ehrh. propagados en medio de cultivo semisólido, obteniendo los mayores contenidos de cardenólidos con 200 mM de cloruro de calcio. Por su parte, en previas investigaciones, Pérez-Alonso et al. (2012) describieron el efecto de la adición de elicitores en brotes cultivados en SIT. El ChitoPlant® a la vez que favoreció la producción de masa fresca y seca por SIT, provocó un incremento en 3,2 veces el contenido de lanatósido C, principal cardenólido de esta especie, respecto al control sin elicitar. Además, se estableció una correlación ( $r=0,893$ ;  $p<0,01$ ) entre marcadores de estrés oxidativo y el contenido de cardenólidos.

Teniendo en cuenta estos antecedentes se estudió el efecto de la adición de elicitores bióticos y abióticos sobre el contenido de cardenólidos y la respuesta morfológica en brotes de *D. purpurea*. Hasta el momento, no existen precedentes del efecto de los elicitores en estudio en *D. purpurea*.

## Materiales y métodos

En esta investigación se utilizó como material vegetal plantas *in vitro* obtenidas a partir de semillas de *Digitalis purpurea* L. var. Roter Berggold. Las semillas fueron adquiridas en la empresa Pharmasaat GmbH (Alemania). Estas fueron desinfectadas según el protocolo propuesto por Erdei et al. (1981). Las mismas fueron colocadas para su germinación en cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h con lámparas fluorescentes de luz blanca, con una intensidad de flujo de fotones fotosintéticos de  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  a  $27\pm 2$  °C de temperatura.

Se empleó el medio de cultivo compuesto por las sales MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementadas con  $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de tiamina y  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa. Se utilizaron frascos de polycarbamato de 500 mL de capacidad a los cuales se añadieron 50 mL de medio de cultivo. Las plántulas obtenidas crecieron hasta alcanzar una altura aproximada de 4,0 cm. Las hojas y raíces de estas fueron cortadas. Los brotes con una altura aproximada de 2,0 cm y en segundo subcultivo fueron transferidos a un medio de cultivo propuesto por Erdei et al. (1981) modificado compuesto por sales MS (100%) suplementado con  $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de tiamina;  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de mioinositol;  $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 6-bencilaminopurina (6-BAP);  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido indol-3-acético (AIA) y  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa. Se utilizaron 40 explantes por tratamiento.

Se ensayaron tres elicitores: jasmonato de metilo (MJ) (Duchefa NV, Holanda) (60, 80 y  $100 \mu\text{M}$ ); ChitoPlant® (ChP®) (Quitosana, Chipro GmbH, Bremen, Alemania) ( $0,001$ ;  $0,01$ ;  $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y SiliPlant® (SiP®) (dióxido de silicio al 35% (p/v), Chipro GmbH, Bremen, Alemania) ( $0,01$ ;  $0,1$ ;  $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Los mismos fueron añadidos al medio de cultivo referido anteriormente. El ChP® y el SiP® fueron añadidos previo a la esterilización. Para el MJ se preparó una solución en etanol a 100 mM y se esterilizó por filtración con una membrana de filtración

ANALIPORE® (OSI) de celulosa estéril, con una porosidad de  $0,22 \mu\text{m}$ .

Los brotes se cultivaron en cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h con lámparas fluorescentes de luz blanca, con una intensidad de flujo de fotones fotosintéticos de  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y ocho horas de oscuridad, a  $27\pm 2$  °C de temperatura.

A los 28 días de cultivo se realizaron las evaluaciones morfológicas referentes a la altura, número de brotes por explante, masa fresca y masa seca por frasco utilizado. Se cuantificaron los contenidos de digoxina y digitoxina. Se calculó la producción neta de cardenólidos ( $\mu\text{g}$  de cardenólidos por frasco de cultivo) teniendo en cuenta la masa seca obtenida por frasco de cultivo.

El protocolo de extracción que se empleó para la determinación de cardenólidos fue el propuesto por Wichtl et al. (1982) con las modificaciones descritas por Pérez-Alonso et al. (2009). La detección de cardenólidos se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Agilent 1100) equipado con un detector de arreglo de diodos y una columna Inertsil ODS-3 ( $150\times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ). Se inyectaron  $10 \mu\text{L}$  de la solución final. Como solvente fue utilizado una mezcla de acetonitrilo (ACN)/agua (25:75) con un flujo de  $1.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . El gradiente varió de la siguiente forma: inicio (25% ACN), 4 min (25% ACN), 34 min (37% ACN), 45 min (50% ACN), a partir de 60 min (25% ACN) hasta 65 min que termina el análisis. Todas las determinaciones fueron realizadas a una temperatura de 40 °C. Los cardenólidos fueron detectados a una longitud de onda de 220 nm. La digitoxina y la digoxina fueron identificados según el tiempo de retención y comparados con los estándares obtenidos de una fuente comercial (SIGMA).

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS ver. 18,0, para el sistema operativo Windows. Para la elaboración de ficheros de datos y gráficos se utilizó el programa EXCEL del paquete Microsoft Office 2007. Para comprobar los supuestos de normalidad se aplicaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov para muestras grandes, de Shapiro-Wilk para muestras pequeñas y de Levene para determinar la homogeneidad de varianza. Se aplicaron análisis no paramétricos en todos los datos puesto que no cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para  $p<0,05$  de significación y las diferencias estadísticas entre los tratamientos fueron determinadas mediante la prueba de Mann Whitney con la penalización de Bonferroni.

## Resultados y discusión

A partir de los resultados obtenidos se determinó que la elicitación es una estrategia que influyó en la producción de biomasa y en el contenido de cardenólidos. La adición de elicitores al medio de cultivo de

multiplicación, en dependencia de la concentración aplicada, provocó cambios en el crecimiento y el desarrollo de los brotes de *D. purpurea*. Por su parte, los análisis por HPLC del contenido de cardenólicos revelaron la presencia de compuestos bioactivos en brotes de *D. purpurea* cultivados en medio de cultivo semisólido. Los elicitores indujeron cambios significativos en la síntesis de cardenólicos con respecto al cultivo sin elicitar, los cuales se describen a continuación.

### ChitoPlant®

La adición de ChitoPlant® en las concentraciones evaluadas produjo una disminución significativa en la altura de los brotes con respecto al tratamiento control sin elicitar (figura 1A). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el número de brotes por explante ni en la masa fresca por frasco respecto al control ni entre las concentraciones ensayadas para cada elicitor. Contradictoriamente, se observó en la variable masa seca un incremento significativo al emplearse la mayor concentración de ChP ( $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ ) (figura 1B). Esto pudo deberse al incremento de lignina y fenoles que provoca la quitosana según Vasconsuelo y Boland (2007).

La adición de ChP en cualquiera de las tres concentraciones ensayadas incrementó los contenidos de digoxina y de digitoxina con respecto al control sin elicitar (figura 2). Sin embargo, entre las concentraciones de ChP evaluadas no se observaron diferencias significativas para los contenidos de digoxina ni digitoxina.

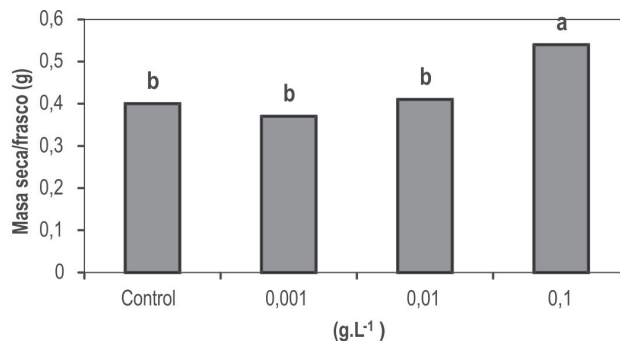
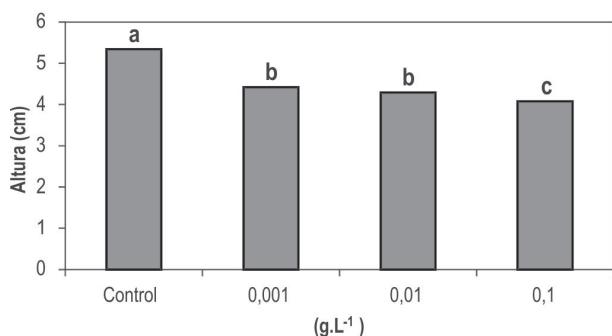
El ChP contiene como ingrediente activo la quitosana, un derivado de la quitina, componente que se encuentra en la pared celular de hongos, en insectos y crustáceos (Mathew y Sankar, 2012). La quitosana activa mecanismos de defensa en las plantas estrechamente relacionados con la inducción de resistencia sistémica al ataque de microorganismos (Agrawal et al., 2002). Sin embargo, su efecto en la inducción de metabolitos se-

cundarios no ha sido ampliamente investigado, lo que dificulta la comparación de resultados en otras especies. En el cultivo de órganos, pocos resultados muestran el efecto del ChP en la producción de biomasa y síntesis de metabolitos secundarios. En el género *Digitalis* solo un estudio previo en *D. lanata* (Pérez-Alonso et al., 2012) muestra el efecto del ChP para la producción de biomasa y cardenólicos y se obtuvo un incremento significativo en lanatósido C ( $316 \mu\text{g.gMS}^{-1}$ ).

Los oligosacáridos como el ChP, han sido descritos como potentes moléculas señales que regulan el crecimiento y desarrollo de las plantas (Sudha y Ravishankar, 2002). Ait Barka et al. (2004) describieron que una concentración de 1,75% (v/v) en el medio de cultivo induce un incremento en el desarrollo de los explantes en *Vitis vinifera* L., pero una concentración de 2,0% (v/v) tuvo un efecto negativo en el cultivo. De manera similar, Kim et al. (2005) observaron un incremento en la altura y la masa fresca de plantas de *Ocimum basilicum* L. (17 y 12% respectivamente) así como en el contenido de fenoles y terpenos con concentraciones de quitosana hasta  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ . Estos resultados muestran que la quitosana provocó un incremento en la biosíntesis de los isoprenoides, aspecto que aplicado a los resultados del presente trabajo, corrobora el aumento del contenido de los cardenólicos ante el ChP como respuesta de defensa de la planta.

### SilioPlant®

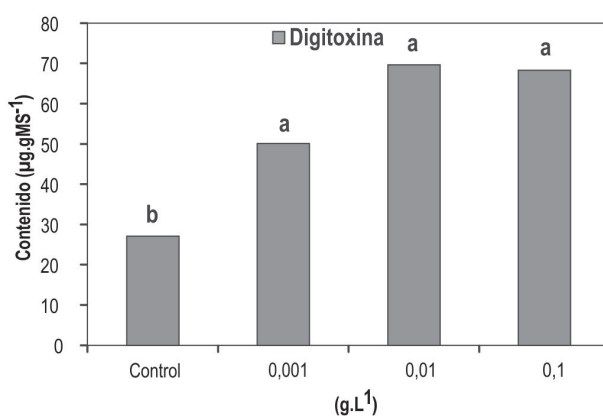
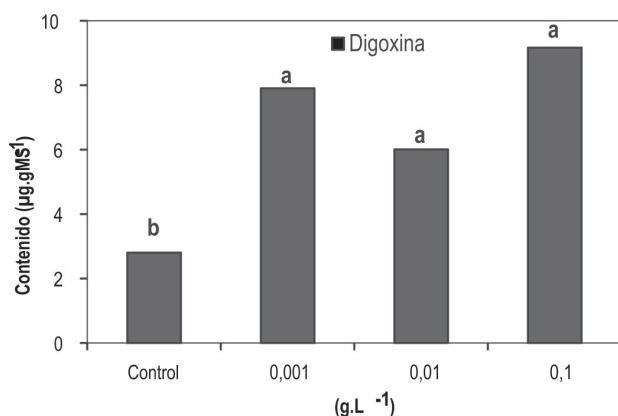
El aumento de las concentraciones de SilioPlant® afectó el desarrollo de los brotes. El tratamiento donde se empleó la menor concentración del SiP mostró un comportamiento similar al control en las variables evaluadas, excepto para la altura que disminuyó con el incremento de las concentraciones ensayadas (figura 3A). En cuanto al número de brotes por explante, la mayor concentración del SiP provocó una disminución con respecto a los tratamientos evaluados y fue la única que mostró diferencias significativas (figura 3B).



**Leyenda:** control se refiere al cultivo sin elicitar

Medias con letras no comunes dentro de cada variable difieren estadísticamente según prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para  $p < 0,05$  ( $n=40$  para número de brotes/explante;  $n=10$  para masa seca por frasco)

**Figura 1.** Efecto del ChitoPlant® en la producción de biomasa de *Digitalis purpurea* L. (A: altura; B: masa seca/frasco) durante 28 días en medios de cultivo semisólidos.



**Leyenda:** control se refiere al cultivo sin elicitar

Medias con letras no comunes para cada cardenólido difieren estadísticamente según prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para  $p < 0,05$  ( $n=4$ )

**Figura 2.** Efecto de la concentración de ChitoPlant® en el contenido de digoxina y digitoxina ( $\mu\text{g.gMS}^{-1}$ ) en brotes de *Digitalis purpurea* L. en medios de cultivos semisólidos a los 28 días de cultivo.

Para las variables masa fresca (figura 3C) y masa seca por frasco (figura 3D) se observó un detrimento en las concentraciones de 0,1 y 1,0  $\text{g.L}^{-1}$ .

El SiP indujo un incremento en el contenido de digoxina y digitoxina excepto en la mayor concentración (1,0  $\text{g.L}^{-1}$ ) que provocó una disminución en el contenido de digoxina sin diferencias significativas respecto al control sin elicitor (figura 4).

Los mayores valores de digoxina (10,0  $\mu\text{g.gMS}^{-1}$ ) y digitoxina (187,8  $\mu\text{g.gMS}^{-1}$ ) se alcanzaron en el tratamiento con 0,01  $\text{g.L}^{-1}$  de SiP, lo que corresponde a incrementos de 3,6 y 6,9 veces en el contenido de digoxina y digitoxina respectivamente, en comparación con el control. Resultados similares fueron observados por Pérez-Alonso *et al.* (2012) quienes alcanzaron un incremento de 2,2 veces el contenido de lanatósido C respecto al control con 0,01  $\text{g.L}^{-1}$  de SiP.

Es de destacar, que a pesar de que todos los tratamientos con SiP incrementaron el contenido de digitoxina en los brotes respecto al control, se observó una disminución de su contenido con concentraciones mayores que 0,01  $\text{g.L}^{-1}$ .

Existen pocos antecedentes sobre la utilización de este elicitor en el cultivo *in vitro*, aunque el efecto beneficioso del silicio en la nutrición en plantas ha sido estudiado en condiciones naturales (Epstein, 2001). El silicio es un elemento bioactivo con un efecto positivo en el crecimiento de las plantas, mejora las propiedades mecánicas de los tejidos, reduce la transpiración y además incrementa la resistencia de las plantas frente a organismos patógenos (Fauteux *et al.*, 2005; Hammerschmidt, 2011). Sin embargo, ninguna de las concentraciones ensayadas provocó una mayor producción de biomasa que en el control sin elicitar.

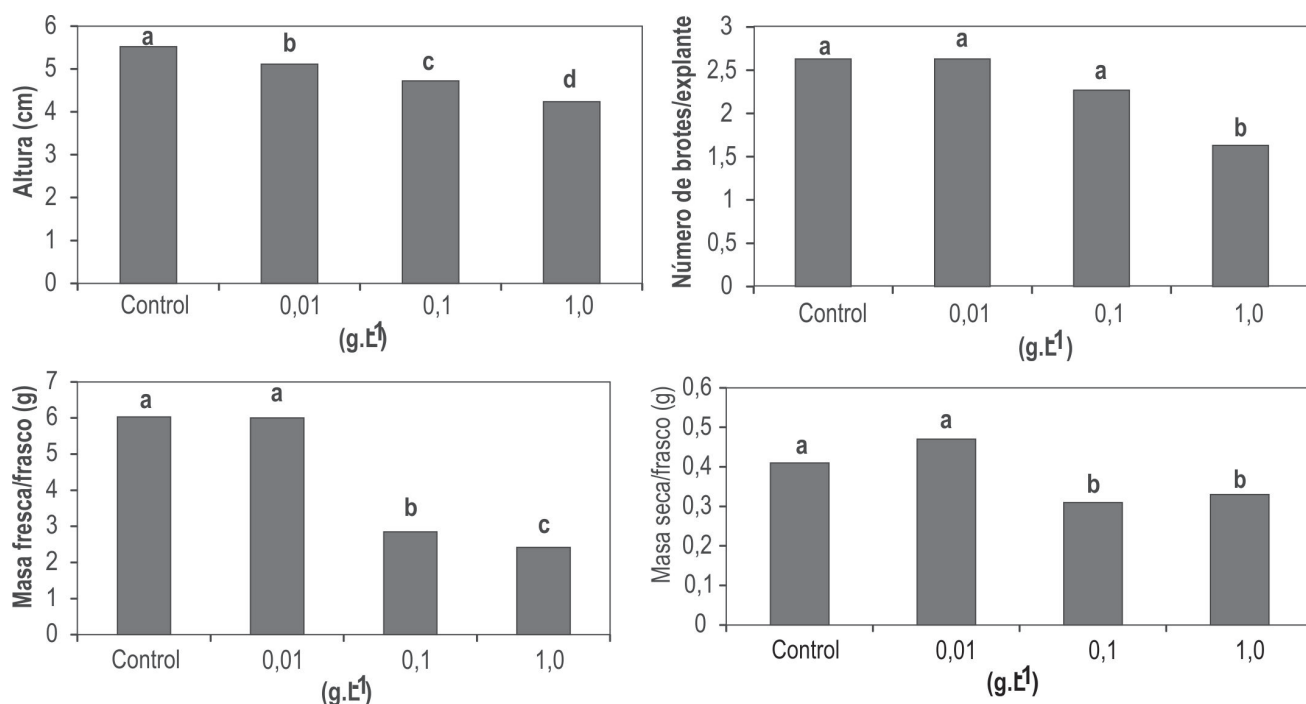
En la actualidad se desconoce la naturaleza exacta de la interacción del silicio con las rutas bioquímicas relacionadas con la resistencia en plantas y por consiguiente en la acumulación de metabolitos secundarios asociados a esta. Al respecto, Fauteux *et al.* (2005) encontró que el silicio actúa en mecanismos comunes para todas las especies de plantas así como en aquellos relacionados con la expresión de genes. Bonilla (2008) refiere que el óxido de silicio se acumula en la pared celular e incrementa su impermeabilidad y resistencia al ataque de patógenos, no solo por constituir una barrera física, sino también por configurar compuestos silico-orgánicos que son muy estables frente a las enzimas de los patógenos.

El efecto positivo del SiP sugiere que este elicitor puede estar asociado con la acumulación de metabolitos secundarios relacionados con los mecanismos de defensa en plantas como los cardenólidos. Sin embargo, no existen ejemplos alentadores que contribuyan a dilucidar su acción en el incremento de cardenólidos.

### Jasmonato de metilo

El jasmonato de metilo provocó un efecto negativo en todas las variables evaluadas independientemente de las concentraciones estudiadas con diferencias significativas respecto al control (figura 5). Al respecto, Howe (2004) afirma que uno de los efectos más notables de los jasmonatos exógenos es la inhibición del crecimiento y Crozier *et al.* (2000) lo describen como un retardador del crecimiento en diversas especies.

Además, en los primeros días de cultivo en los tratamientos con MJ los ápices de los brotes tenían una coloración violeta rojo pálido y a los 28 días las hojas mostraban una coloración verde pálido similar al color de plantas con clorosis. Siguiendo a Zacarías y Lafuen-



**Leyenda:** control se refiere al cultivo sin elicitar

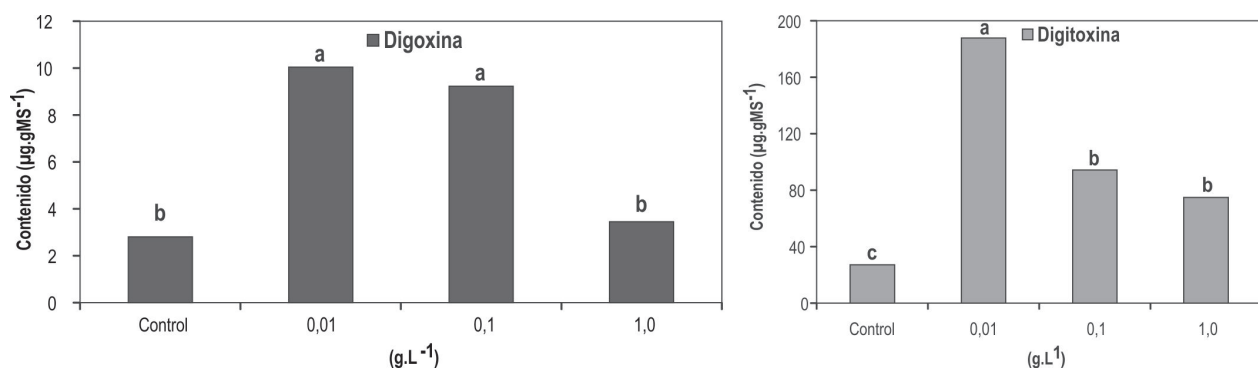
Medias con letras no comunes dentro de cada variable difieren estadísticamente según prueba de *Kruskal-Wallis/Mann-Whitney* para  $p < 0,05$  ( $n=40$  para altura y número de brotes/explante;  $n=10$  para masas fresca y seca por frasco)

**Figura 3.** Efecto del SilioPlant® en la producción de biomasa de *Digitalis purpurea* L. (A: altura; B: número de brotes/explante; C: masa fresca/frasco; D: masa seca/frasco) durante 28 días en medios de cultivo semisólidos.

te (2008), esto podría atribuirse a que la aplicación del MJ provoca una disminución en la expresión de los genes involucrados en la fotosíntesis y una reducción en el contenido de clorofila en las hojas de las plantas.

Los metabolismos primario y secundario comparten rutas y precursores, en los cuales la utilización de fuentes nutricionales disponibles como el carbono y el nitrógeno dependen en parte de la presencia de un

grado de estrés que afecten a las plantas (Tisserat y Vaughn, 2008). Este estrés puede ser ocasionado por elicitors, los cuales pueden activar rutas metabólicas que dan origen a los metabolitos secundarios, por lo que la planta desvía parte del material del metabolismo primario para estos fines. Por esta razón, las plantas bajo tratamiento con elicitors pueden mostrar cambios morfológicos como disminución o detención del

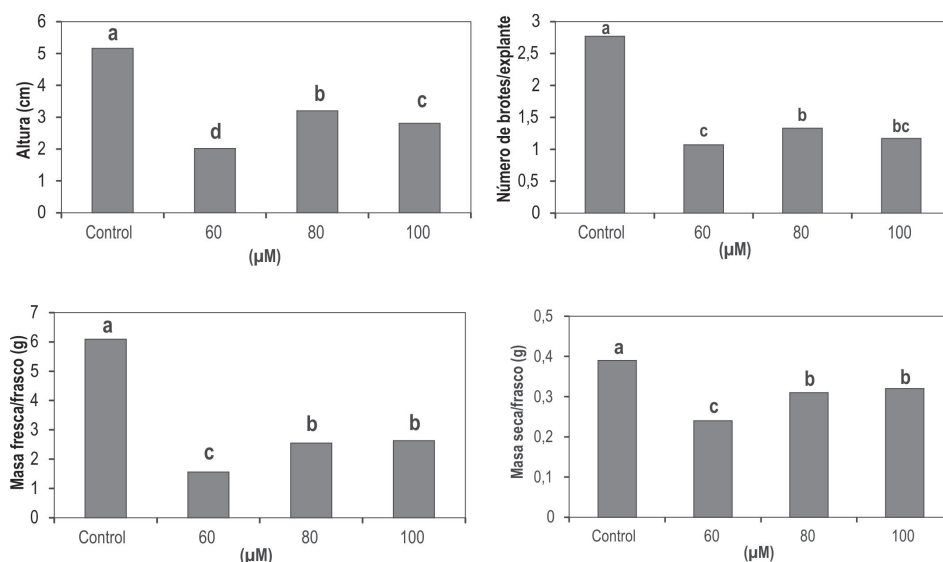


**Leyenda:** control se refiere al cultivo sin elicitar

Medias con letras no comunes para cada cardenólido difieren estadísticamente según prueba de *Kruskal-Wallis/Mann-Whitney* para  $p < 0,05$  ( $n=4$ )

**Figura 4.** Efecto de la concentración de SilioPlant® en el contenido de digoxina y digitoxina (µg.gMS<sup>-1</sup>) en brotes de *Digitalis purpurea* L. en medios de cultivos semisólidos a los 28 días de cultivo.





**Leyenda:** control se refiere al cultivo sin elicitar

Medias con letras no comunes dentro de cada variable difieren estadísticamente según prueba de *Kruskal-Wallis/Mann-Whitney* para  $p < 0,05$  ( $n=40$  para altura y número de brotes/explante;  $n=10$  para masa fresca y seca por frasco)

**Figura 5.** Efecto del jasmonato de metilo en la producción de biomasa de *Digitalis purpurea* L. (A: altura; B: número de brotes/explante; C: masa fresca/frasco; D: masa seca/frasco) durante 28 días en medios de cultivo semisólidos.

crecimiento. Este efecto supresor en el metabolismo primario ha sido descrito para el ácido jasmónico por Coste *et al.* (2011) en brotes de *Hypericum hirsutum* L. e *Hypericum maculatum* Crantz. De igual manera, Hu *et al.* (2011) informaron de la reducción de la biomasa por el efecto del MJ en el cultivo de suspensiones celulares de *Fagopyrum esculentum* L.

La adición de MJ en las concentraciones ensayadas indujo variaciones en el contenido de digoxina y digitoxina (figura 6). La mayor concentración (100µM) provocó un incremento en el contenido de ambos cardenólidos con diferencias significativas respecto al control. El incremento de la digitoxina fue más notable (37 µg.gMS<sup>-1</sup>) y difirió significativamente con el resto de las concentraciones evaluadas. Mientras, el mayor valor de digoxina se alcanzó en el tratamiento con 80µM (9,4 µg.gMS<sup>-1</sup>) con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos, que equivale a un aumento de 3,3 veces con respecto al control. Estos resultados indican que el MJ podría influir diferencialmente en las enzimas asociadas a la producción de cardenólidos.

El efecto de los jasmonatos en el incremento de un metabolito y en el detrimento de otro, ha sido observado por Coste *et al.* (2011) en brotes de *H. hirsutum*. La inducción de metabolitos secundarios es uno de los efectos del MJ comúnmente observado (Kim *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2011; Mathew y Sankar, 2012). Autores como Gundlach *et al.* (1992) demostraron que la inducción por el jasmonato no es específica para un tipo de metabolito, sino que influye de manera general

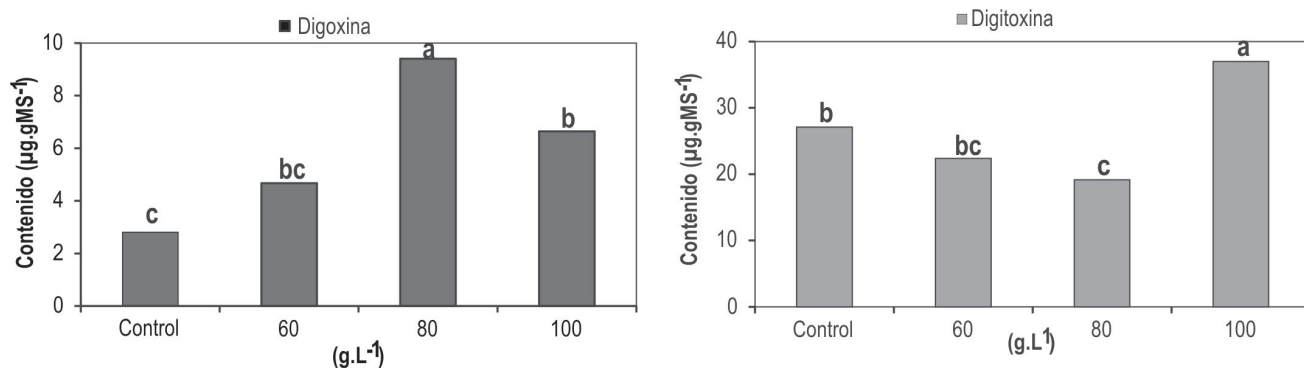
en un amplio espectro de sustancias de bajo peso molecular tales como flavonoides, antraquinonas y varias clases de alcaloides.

Por su parte, Kim *et al.* (2009) indujeron cambios en el contenido de ginsenósidos en el cultivo de raíces de *Panax ginseng* C.A. Meyer, mediante la elicitación con el MJ.

Haciendo un análisis del efecto de los elicitores en la producción neta por frasco de cultivo (tabla 1), los mejores resultados se alcanzaron en el tratamiento con 0,01 g.L<sup>-1</sup> de SiP (4,72 µg de digoxina y 88,27 µg de digitoxina). El segundo mejor resultado se obtuvo en el tratamiento con 0,1 g.L<sup>-1</sup> de ChP, que alcanzó una producción neta por frasco de cultivo de 4,95 µg de digoxina y 36,88 µg de digitoxina. Esta variable ha sido utilizada con el objetivo de evaluar las potencialidades del método desarrollado para la producción a nivel comercial. A su vez, ratifica la importancia de la producción de biomasa para obtener una mayor producción de cardenólidos en *D. purpurea*.

Estos resultados muestran que el tipo y el contenido de los cardenólidos dependen de la concentración y del elicitor utilizado en el cultivo de brotes de *D. purpurea*. Este aspecto ha sido señalado por autores como Ruiz-May *et al.* (2009) quienes describieron que el tipo de alcaloides y su acumulación en el cultivo de raíces de *Catharanthus roseus* L. estuvieron relacionados con ambos factores.

La acumulación de metabolitos secundarios en plantas es considerada como una respuesta de defensa al



**Leyenda:** control se refiere al cultivo sin elicitar

Medias con letras no comunes para cada cardenólido difieren estadísticamente según prueba de *Kruskal-Wallis/Mann-Whitney* para  $p < 0,05$  ( $n=4$ )

**Figura 6.** Efecto de la concentración de jasmonato de metilo en el contenido de digoxina y digitoxina ( $\mu\text{g.gMS}^{-1}$ ) en brotes de *Digitalis purpurea* L. en medios de cultivos semisólidos a los 28 días de cultivo.

ataque de patógenos, la cual es activada por elicitores que actúan como compuestos de señalización de las respuestas de defensa en plantas (Namdeo, 2007; Pawar et al., 2011). En *Digitalis* se conoce que la síntesis de cardenólidos ocurre como un mecanismo de defensa de la planta ante el ataque de insectos (Wink, 2010).

Teniendo en cuenta las valoraciones realizadas por Pérez-Bermúdez et al. (2010) sobre los genes relacionados con la ruta biosintética de los cardenólidos, específicamente el *P5 $\beta$ R2* cuya expresión fue independiente del MJ, es posible que el incremento de estos con el MJ se deba a la interacción sinérgica entre el etileno y el jasmonato y no al efecto aislado del MJ. Para ambos se ha descrito su contribución significativa a la resistencia contra herbívoros (Onkokesung et al., 2010). Los mecanismos de defensa en plantas

están interconectados por una compleja red de rutas de señalización de hormonas (Pieterse et al., 2009; Mejía-Teniente et al., 2010). Estas rutas responden a condiciones de estrés o a elicitores, que modulan la biosíntesis de compuestos de defensa como un resultado combinado de las acciones múltiples de señalización (Zhao et al., 2005).

Aunque se han considerado muchas hipótesis sobre los mecanismos de acción de los elicitores, aún es necesario el estudio de los mismos. Los elicitores, a una concentración apropiada, pueden actuar como moléculas de señalización, las cuales son percibidas por un receptor presente en la membrana plasmática y que inicia la señal de transducción (Vasconsuelo y Boland, 2007). De esta manera, involucra la expresión de genes y la activación de rutas metabólicas implicadas en la biosíntesis del compuesto deseado. Al res-

**Tabla 1.** Efecto de elicitores en la producción neta por frasco de cultivo de digoxina y digitoxina en brotes de *Digitalis purpurea* L. cultivados en medios de cultivo semisólidos durante 28 días.

Tratamientos	Digoxina ( $\mu\text{g}$ )	Digitoxina ( $\mu\text{g}$ )
Control sin elicitar	1,12	10,84
ChitoPlant®0,001 g.L <sup>-1</sup>	2,92	18,55
ChitoPlant® 0,01 g.L <sup>-1</sup>	2,46	28,55
ChitoPlant®0,1 g.L <sup>-1</sup>	4,95	36,88
SilioPlant®0,01 g.L <sup>-1</sup>	4,72	88,27
SilioPlant®0,1 g.L <sup>-1</sup>	2,86	29,20
SilioPlant® 1,0 g.L <sup>-1</sup>	1,14	24,70
Jamonato de metilo 60 $\mu\text{M}$	1,12	5,38
Jamonato de metilo 80 $\mu\text{M}$	2,92	5,94
Jamonato de metilo 100 $\mu\text{M}$	2,12	11,83

pecto, Orlita et al. (2008) consideraron que debido al escaso conocimiento de las rutas de biosíntesis de los metabolitos secundarios, el efecto de un elicitador en el cultivo de células o de tejidos no es predecible. Al respecto, Bhagwath y Hjortso (2000) utilizaron un diseño factorial donde incluyeron varios factores para la producción de metabolitos secundarios en el cultivo de raíces de *Ambrosia artemisiifolia* L. y notaron que la mayoría de los métodos de elicitación son empíricos.

En el caso específico de las especies de *Digitalis*, hay limitada información acerca de la acumulación de cardenólidos mediante el uso de elicitores en el cultivo *in vitro*. En la literatura científica consultada solo existe una investigación desarrollada en *D. lanata* (Ghanem et al., 2010), quienes describen el estudio de elicitores como el ácido salicílico, el extracto de levadura y el cloruro de calcio. Este último elicitador incrementó el contenido total de cardenólidos 2,9 veces comparado con las plantas no elicidadas.

Los cardenólidos están constituidos por una genina o aglicona que contiene el núcleo esteroide y una secuencia de moléculas de azúcares generalmente raros que se producen durante el ciclo de las pentosas como las digitoxosas (Piñol et al., 2008). En *Digitalis* la serie más común es la A pero la de mayor importancia es la C, la diferencia entre sus geninas está en el grupo OH que tiene la digoxina en el carbono 12 mientras que la digitoxina tiene un grupo hidrógeno, puede ser que fenómenos como la hidroxilación se vean afectados por elicitores. Se desconoce cuáles variaciones encontradas en las series A y C son determinadas genéticamente o cuáles pueden ser causadas por factores ambientales o externos (Yücesan, 2011).

Teniendo en cuenta los procesos relacionados con la síntesis de metabolitos secundarios podemos especular sobre su efecto en algunos aspectos básicos aunque no existen evidencias que confirmen los posibles mecanismos en los que influyen directamente los elicitores. Estas pueden estar relacionadas con afectaciones en el metabolismo primario que modulan la expresión de moléculas del metabolismo primario involucrado en el transporte a vacuolas donde se almacenan dichos metabolitos, limiten o favorezcan precursores de la ruta del ácido mevalónico descrita como ruta de biosíntesis de cardenólidos (Kreis y Müller-Uri, 2013). Por otra parte pueden alterar la localización o la solubilidad de las enzimas, activar aquellas específicas que regulan la síntesis de digitoxina, en detrimento de las enzimas que rigen la síntesis de digoxina. Las acetiltransferasas y glucosiltransferasas (Kreis et al., 1986; Kandzia et al., 1998) juegan importantes roles en la ruta biosintética de los cardenólidos y podría especularse que el ChP y en mayor medida el SiP, promovieran la glucosilación y la acetilación provocando un incremento en el contenido de los cardenólidos, aunque se requiere de nuevos experimentos para probar esta hipótesis.

Como estrategia para estimular la síntesis de metabolitos secundarios, la elicitación ha tenido una marcada aplicación comercial en los últimos años (Savitha et al., 2006). A esto se le adiciona, que podrían permitir el estudio de genes relacionados con la biosíntesis de cardenólidos mediante la evaluación de la expresión de los mismos ante el efecto del elicitador.

## Conclusiones

Se demostró que la elicitación es una estrategia viable para el incremento de cardenólidos en brotes de *D. purpurea* en medio de cultivo semisólido. El SilioPlant® a razón de 0,01 g.L<sup>-1</sup> permitió incrementar en 3,6 y 6,9 veces el contenido de digoxina y digitoxina respectivamente.

## Referencias bibliográficas

- Agrawal, GK.; Rakwal, R., Tamogami, S., Yonekura, M., Kubo, A., Saji, H. 2002. Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. *Plant Physiology & Biochemistry*. 40: 1061-1069.
- Ait Barka, E., Eullaffroy, P., Clément, C., Vernet, G. 2004. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Report*. 22: 608-614.
- Bhagwath, SG., Hjortso, MA. 2000. Statistical analysis of elicitation strategies for thiarubineA production in hairy root cultures of *Ambrosia artemisiifolia*. *Journal of Biotechnology*. 80: 159-167.
- Bonilla, I. 2008. Introducción a la nutrición mineral de las plantas. Los elementos minerales. En: Azcón-Bieto, J., Talón, M. Fundamentos de fisiología vegetal. Mc Graw Hill Interamericana, Madrid, pp 103-121.
- Coste, A.; Vlase, L., Halmagyi, A.; Deliu, C.; Coldea, G. 2011. Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*. 106: 279-288.
- Crozier, A., Kamiya, Y., Bishop, G., Yokota, T. 2000. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. En: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds) Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp 850-929.
- Epstein, E. 2001. Silicon in plants: facts vs concepts. En: Datnoff LE, Snyder GH, Korndörfer GH (Eds) Silicon in agriculture. Elsevier, Amsterdam, pp 1-16.
- Erdei, I.; Kiss, Z.; Maliga, P. 1981. Rapid clonal multiplication of *Digitalis lanata* in tissue culture. *Plant Cell Report*. 1: 34-35.
- Fauteux, F.; Rémus-Borel, W., Menzies, JG., Bélanger, RR. 2005. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letter*. 249: 1-6.
- Fischer, R.; Twyman, RM.; Hellwig, S.; Drossard, J.; Schillberg, S. 2007. Facing the future with pharmaceuticals from plants. Proceedings of the 11th IAPTC&B Congress, Beijing, China. Dordrecht: Springer Netherlands. pp 13-32.
- Gavidia, I.; Tarrío, R.; Rodríguez-Trelles, F.; Pérez-Bermúdez, P.; Seitz, H. 2007. Plant progesterone 5 $\beta$ -reductase is not homologous to the animal enzyme. Molecular evolutionary characterization of P5 $\beta$ R from *Digitalis purpurea*. *Phytochemistry*. 68: 853-864.
- Ghanem, SA.; Aboul-Enein, AM.; El-Sawy, A.; Rady, MR.; Ibrahim, MM. 2010. *In vitro* propagation and cardiac glycosides content of *Digitalis lanata*. *International Journal of Academic Research*. 2: 349-356.
- Gundlach, H., Müller, M., Kutchan, T., Zenk, M. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academic of Science. USA* 89: 2389-2393.

- Gurel, E.; Yücesan, B.; Aglic, E.; Gurel, S.; Verma, SK.; Sokmen, M.; Sokmen, A. 2010. Regeneration and cardiotonic glycoside production in *Digitalis davisiana* Heywood (Alanya Foxglove). *Plant Cell Tissue & Organ Culture*. 104: 217-225.
- Hagimori, M.; Matsumoto, T.; Obi, Y. 1983. Effects of mineral salts, initial pH and precursors on digitoxin formation by shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. Grown in liquid media. *Agriculture and Biological Chemistry*. 47: 565-571.
- Hammerschmidt, R. 2011. More on silicon-induced resistance. *Physiological & Molecular Plant Pathology*. 75: 81-82.
- Hornberger, M.; Böttigheimer, U.; Hillier-Kaiser, A.; Kreis, W. 2000. Purification and characterisation of the cardenolide-specific [beta]-glucosyltransferase CGH II from *Digitalis lanata* leaves. *Plant Physiology & Biochemistry*. 38: 929-936.
- Howe, G. 2004. The roles of hormones in defense against insects and disease. Jasmonates. En: Davies P (Ed). *Plant hormones: Biosynthesis, Signal transduction, Action!* Kluwer Academic Publishers. pp 610-634.
- Hu, Y-H.; Yu, Y-T., Piao, C-H., Liu, J-M., Yu, H-S. 2011. Methyl jasmonate- and salicylic acid-induced D-chiro-inositol production in suspension cultures of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Plant Cell Tissue & Organ Culture*. 106: 419-424.
- Kandzia, R.; Grimm, R.; Eckerskorn, C.; Lindemann, P.; Luckner, M. 1998. Purification and characterization of lanatoside 15-O-acetyltransferase from *Digitalis lanata* Ehrh. *Planta*. 204: 383-389.
- Kim, HJ., Chen, F., Wang, X.; Rajapakse, NC. 2005. Effect of chitosan on the biological properties of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural & Food Chemistry*. 53: 3696-3701.
- Kim, OT.; Bang, KH., Kim, YC.; Hyun, DY.; Kim, MY.; Cha, SW. 2009. Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng hairy root cultures elicited by methyl jasmonate. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 98: 25-33.
- Kim, OT.; Bang, KH., Shin, YS., Lee, MJ., Jung, SJ., Hyun, DY., Kim, YC., Seong, NS., Cha, SW., Hwang, B. 2007. Enhanced production of asiaticoside from hairy root cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban elicited by methyl jasmonate. *Plant Cell Report*. 26: 1941-1949.
- Kreis, W.; May, U.; Reinhard, E. 1986. UDP-glucose:digitoxin 162-O-glucosyltransferase from suspension-cultured *Digitalis lanata* cells. *Plant Cell Report*. 5: 442-445.
- Kreis, W.; Müller-Uri, F. 2013. Cardenolide aglycone formation in *Digitalis*. En: Bach, TJ.; Rohmer, M. (Eds) *Isoprenoid synthesis in plants and microorganisms: new concepts and experimental approaches*. Springer Science+Business Media New York. pp 425-438.
- Kuate, SP.; Pádua, RM.; Eisenbeiss, WF.; Kreis, W. 2008. Purification and characterization of malonyl-coenzyme A: 21-hydroxypregnane 21-O-malonyltransferase (Dp21MaT) from leaves of *Digitalis purpurea* L. *Phytochemistry*. 69: 619-626.
- Lewis, JA. 2009. Molecule of the month. Digoxin blocks tumor growth through HIF-1 inhibition. *Current Topic in Medicinal Chemistry*. 9: 117
- Lindemann, P.; Luckner, M. 1997. Biosynthesis of pregnane derivatives in somatic embryos of *Digitalis lanata*. *Phytochemistry*. 46: 507-513.
- Liu, XN.; Zhang, XQ.; Zhang, SX.; Sun, JS. 2007. Regulation of metabolite production by precursors and elicitors in liquid cultures of *Hypericum perforatum*. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*. 91: 1-7.
- Mathew, R.; Sankar, PD. 2012. Effect of methyl jasmonate and chitosan on growth characteristics of *Ocimum basilicum* L., *Ocimum sanctum* L. and *Ocimum gratissimum* L. cell suspension cultures. *African Journal of Biotechnology*. 11: 4759-4766.
- Mejía-Teniente, L.; Torres-Pacheco, I.; González-Chavira, MM.; Ocampo-Velázquez, RV.; Herrera-Ruiz, G.; Chapa-Oliver, AM.; Guevara-González, RG. 2010. Use of elicitors as an approach for sustainable agriculture. *African Journal of Biotechnology*. 9: 9155-9162.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Namdeo, AG. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews*. 1: 69-79.
- Onkokesung, N.; Baldwin, IT., Gális, I. 2010. The role of jasmonic acid and ethylene crosstalk in direct defense of *Nicotiana attenuata* plants against chewing herbivores. *Plant Signaling & Behavior*. 5: 1305-1307.
- Orlita, A.; Sidwa-Gorycka, M.; Kumirska, J.; Malinski, E.; Siedlecka, E.; Gajdus, J., Lojkowska, E., Stepnowski, P. 2008. Identification of *Ruta graveolens* L. metabolites accumulated in the presence of abiotic elicitors. *Biotechnology Progress*. 24: 128-133.
- Paek, KY.; Chakrabarty, D.; Hahn, EJ. 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*. 81: 287-300.
- Pawar, KD., Yadav, AV., Shouche, YS.; Thengane, SR. 2011. Influence of endophytic fungal elicitation on production of inophyllum in suspension cultures of *Calophyllum inophyllum* L. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*. 106: 345-352.
- Pérez-Alonso, N.; Capote, A.; Gerth, A.; Jiménez, E. 2012. Increased cardenolides production by elicitation of *Digitalis lanata* shoots cultured in temporary immersion systems. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*. 110: 153-162.
- Pérez-Alonso, N.; Wilken, D.; Gerth, A.; Jahn, A.; Nitzsche, HM.; Kerns, G.; Capote, A.; Jiménez, E. 2009. Cardiotonic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*. 99: 151-156.
- Pérez-Bermúdez, P.; Moya García, A.; Tuñón, I.; Gavidia, I. 2010. *Digitalis purpurea* P5βR2, encoding steroid 5β-reductase, is a novel defense-related gene involved in cardenolide biosynthesis. *New Phytologist*. 185: 687-700.
- Pieterse, CM., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S.; Van Wees, SC. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*. 5:308-316.
- Piñol, MT.; Palazón, J.; Cusidó, RM. 2008. Introducción al metabolismo secundario. En: Azcón-Bieto, J.; Talón, M. (Eds). *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw Hill Interamericana, Madrid. pp 323-348.
- Roca-Pérez, L.; Boluda, R.; Gavidia, I.; Pérez-Bermúdez, P. 2004. Seasonal cardenolide production and *Dop5br* gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. *Phytochemistry*. 65: 1869-1878.
- Ruiz-May, E., Galaz-Ávalos, RM., Loyola-Vargas, VM. 2009. Differential secretion and accumulation of terpene indole alkaloids in hairy roots of *Catharanthus roseus* treated with methyl jasmonate. *Molecular Biotechnology*. 41: 278-285.
- Saito, K.; Yamazaki, M.; Shimomura, K.; Yoshimatsu, K.; Murakoshi, I. 1990. Genetic transformation of foxglove (*Digitalis purpurea*) by chimeric foreign genes and production of cardioactive glycosides. *Plant Cell Report*. 9: 121-124.
- Sales, E.; Müller-Uri, F.; Nebauer, SG.; Segura, J.; Kreis, W.; Arillaga, I. 2011. *Digitalis*. En: Kole, C. (Ed) *Wild crop relatives: genomic and breeding resources, plantation and ornamental crops*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 73-112.
- Savitha, BC.; Timmaraju, R.; Bhagyalaksami, N.; Ravishankar, GA. 2006. Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake flask and bioreactor. *Process Biochemistry*. 41: 50-60.
- Sudha, G., Ravishankar, G. 2002. Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*. 71: 181-212.
- Tisserat, B.; Vaughn, S. 2008. Growth, morphogenesis, and essential oil production in *Mentha spicata* L. plantlets *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 44: 40-50.
- Vanisree, M.; Tsay, H-S. 2007. Plant cell cultures: Production of biologically important secondary metabolites from medicinal



- plants of Taiwan. En: Kayser, O.; Quax, W. (Eds) Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. pp 267-285.
- Vasconsuelo, A.; Boland, R. 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*. 172: 681-875.
- Wichtl, M.; Mangkudidjojo, M.; Wichtl-Bleier, W. 1982. Hochleistungs-flüssigkeits-chromatographische analyse von digitalis-blatttext-rakten. *Journal Chromatography*. 234: 503-508.
- Wink, M. 2010. Introduction: biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. En: Wink, M. (Ed) Biochemistry of plant secondary metabolism. *Annual Plant Rev.* 40: 1-19.
- Yoshimatzu, K.; Satake, M.; Shimomura, K.; Sawada, J.; Terao, T. 1990. Determination of cardenolides in hairy root cultures of *D. lanata* by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Natural Products*. 53: 1498-1502.
- Yücesan, B. 2011. *In vitro* propagation and cardiac glycoside production in endemic *Digitalis* L. species de Anatolia. Thesis submitted to the graduate school of natural and applied sciences of the Abant Izzet Baysal University, Turkey. p. 99.
- Zacarías, L.; Lafuente, MT. 2008. Etileno, ácido abscísico y otros reguladores del desarrollo. En: Azcón-Bieto, J., Talón, M. Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw Hill Interamericana, Madrid. pp 445-465.
- Zhang, H.; Memelink, J. 2009. Regulation of secondary metabolism by jasmonate hormones. En: Osbourn, AE.; Lanzotti, V. (Eds). Plant-derived Natural Products. © Springer Science + Business Media, LLC. pp 181-194.
- Zhao, J.; Davis, LC.; Verporte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 23: 283-333.

# Caracterización morfológica y evaluación de resistencia a *Fusarium oxysporum* en especies silvestres del género *Solanum* sección *Lycopersicon*

## Morphological characterization and resistance evaluation to *Fusarium oxysporum* in wild species *Solanum* genera *Lycopersicon* section

María Natalia Morales Palacio\*, Georgina Espinosa López\*\*, Ángel Rafael Morales Astudillo\*\*\*, Byron Rafael Sánchez Masache\*\*\*\*, Ángel Miguel Jiménez Castillo\*\*\*\*, Yoamel Milián-García\*\*\*\*\*

### Resumen

Con el objetivo de evaluar la variación morfológica y la resistencia a *Fusarium oxysporum* en la colección del banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Loja (UNL), 146 accesiones de cuatro especies silvestres fueron seleccionadas (*Solanum pimpinellifolium*, *S. neorickii*, *S. habrochaites*, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*); y, 20 accesiones de tomate cultivado (*S. lycopersicum*). Un total de 723 plántulas se transplantaron al campo y se evaluaron morfológicamente durante todo su ciclo biológico, con un descriptor que incluyó 20 caracteres cuantitativos y 25 cualitativos. Se estimó la variabilidad morfológica y se detectaron diferencias fenotípicas relacionadas con el fruto, características vegetativas de las plantas y los componentes del rendimiento. Las variables morfológicas mostraron que *S. habrochaites* es la especie más diferenciada con relación a las restantes. La podredumbre vascular causada por *F. oxysporum* es responsable de enormes pérdidas en la producción de tomate en el mundo; sin embargo, las especies silvestres que originaron las variedades cultivadas poseen genes de interés agronómico, utilizados por décadas para la generación de variedades resistentes. Por ello, entre 64 y 228 individuos por especie, se evaluaron por tres procedimientos de inoculación. Todas las especies fueron significativamente diferentes en los niveles de resistencia, tolerancia o susceptibilidad. *S. neorickii* fue más resistente y tolerante, seguida de *S. pimpinellifolium* y *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, mientras que todas las variedades cultivadas (*S. lycopersicum*) fueron susceptibles. Tales circunstancias permitieron determinar sin lugar a dudas, que las plantas sobrevivientes y tolerantes poseen un genotipo particular que determina esa característica.

**Palabras clave:** Ecuador, tomate, tolerancia, susceptibilidad, inoculación.

### Abstract

In order to evaluate the morphological variation and *Fusarium oxysporum* resistance in the National University of Loja (UNL) genebank collection, 146 wild accessions of four species were selected (*Solanum pimpinellifolium*, *S. neorickii*, *S. habrochaites*, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) and 20 accessions of cultivated tomato (*S. lycopersicum*). For a total of 723 seedlings were transplanted to the field and evaluated morphologically throughout its life cycle, with a descriptor that included 20 quantitative and 25 qualitative characters. Morphological variability was estimated were detected phenotypic differences related the fruit, plant vegetative characteristics and yield components. Morphological variables showed that *S. habrochaites* is the most differentiated with respect to the others. Vascular rot caused by *F. oxysporum* is responsible for huge losses in tomato production in the world, but the wild species that gave rise to the cultivated varieties have agronomic interest

\* Ingeniera Agrónoma, Magister en Biotecnología, Centro de Biotecnología, Universidad Nacional de Loja, Ciudadela "Guillermo Falconí Espinosa" sector La Argelia, Loja-Ecuador, Teléfono (593) 0998885879, nataliamorales88@yahoo.es

\*\* Bióloga, PhD en Ciencias Biológicas, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Ciudad de la Habana- Cuba, Teléfono (537-830 9821), georgina@fbio.uh.cu

\*\*\* Ingeniero Agrónomo, PhD en Ciencias Naturales, Profesor Titular, Universidad Nacional de Loja, Teléfono (593) 2579077, amoralesastudillo@yahoo.es

\*\*\*\* Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional de Loja.

\*\*\*\*\* Licenciado en Bioquímica, Magister en Bioquímica, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Ciudad de la Habana- Cuba, Teléfono (537-830 9821), yoamel@fbio.uh.cu

genes used for decades to generate resistant varieties. Therefore, between 64 and 228 individuals per species were evaluated for three inoculation procedures. All species were significantly different between levels of resistance, susceptibility or tolerance. *S. neorickii* was more resistant and tolerant, followed by *S. pimpinellifolium* and *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, while all cultivars (*S. lycopersicum*) were susceptible. Such circumstances allowed undoubtedly determine that survivors and tolerant plants have a particular genotype that determines the characteristic.

**Key words:** Ecuador, tomatoe, tolerance, susceptibility, inoculation.

**Recibido:** agosto 5 de 2013

**Aprobado:** abril 21 de 2014

## Introducción

El centro primario de origen del tomate y de las especies silvestres emparentadas se halla en las regiones situadas a lo largo de la Cordillera de los Andes de Ecuador y Perú. Particularmente el Ecuador reconocido como “mega diverso”, es custodio de una parte considerable de la variabilidad genética de especies de interés económico y social; no obstante, dicha diversidad es poco conocida, miles de especies continúan desconocidas para la ciencia o subutilizadas para la humanidad y sólo aprovechadas por la fauna silvestre, desconociéndose su potencialidad como fuente de alimento, materia prima y medicamentos (Bernal y Correa 1990).

Un caso puntual en donde reside toda la variabilidad genética disponible y fundamental para el desarrollo de programas de mejora genética, lo constituyen las especies silvestres de la sección *Lycopersicon*. Estas han sido y continúan siendo utilizadas de forma potencial para el mejoramiento genético de las variedades cultivadas por investigadores de otros países. Las potencialidades de su empleo estriba en características de gran interés agronómico tales como: tolerancia a la humedad, resistencia a hongos e insectos, mejora del color de los frutos, tolerancia a la salinidad del suelo, tolerancia a heladas, resistencia a la sequía, alto contenido de licopeno, entre otros (Nuez 1995).

En Ecuador el tomate se cultiva ampliamente, tanto en la costa como en la sierra, donde constituye única fuente de ingresos para muchos agricultores; sin embargo las semillas que se emplean provienen por lo general de variedades generadas en países europeos.

El principal problema con estas variedades ha sido durante décadas, la incidencia de plagas y enfermedades, situación que ha llevado al abuso de productos pesticidas en su mayoría de alta peligrosidad, realizándose entre 30 y 35 aplicaciones por ciclo (INIAP 2001). Este manejo irracional del cultivo, conlleva un alto riesgo tanto para los consumidores, como para la salud del agricultor, ruptura del equilibrio biológico, falta de efectividad de los insecticidas por el desarrollo de resistencia, y encarecimiento de los costos de producción (Valarezo 2002). Particularmente, *Fusarium oxysporum* es un hongo cosmopolita que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de

plantas gimnospermas y angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchas plantas (Bosland 1988).

La marchitez vascular del tomate producida por el hongo, es una enfermedad importante en el mundo (Hartman y Fletcher 1991). El patógeno causa pudrición radical y lesiones necróticas extensivas en el cuello y base del tallo, marchitez y muerte. Las lesiones necróticas con frecuencia ascienden hasta 30 cm a partir del cuello de la planta, las cuales mueren generalmente al inicio de la maduración de los frutos, causando la pérdida total de la producción (Jarvis 1988).

Tomando en cuenta que las variedades actualmente comercializadas en el mundo, provienen de especímenes silvestres colectados desde su hábitat natural Peralta et al. (2006), y que en el proceso, se han relegado genes de enorme interés agronómico y de resistencia específica a las razas fisiológicas locales, este material puede ser empleado para incorporar a los cultivos comerciales genes de resistencia específicos para las condiciones del país.

El Centro de Biotecnología de la Universidad de Loja, provincia de Loja-Ecuador, posee uno de los bancos de germoplasma de especies silvestres del género *Solanum* más grandes y completos del mundo, cuyo material ha sido caracterizado parcialmente a nivel morfológico.

Es así que este trabajo se propone caracterizar desde el punto de vista morfológico, cuatro especies silvestres del género *Solanum* y evaluar su comportamiento ante la inoculación controlada de *Fusarium oxysporum*.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

La diversidad morfológica fue estimada en un total de 166 accesiones de la colección del banco de germoplasma del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja-Ecuador (UNL). La colección incluyó 146 accesiones colectadas en Ecuador y Perú, pertenecientes a cuatro especies silvestres del género *Solanum* sección *Lycopersicon* [dos del grupo *Lycopersicon* (*Solanum pimpinellifolium* L., *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* Dunal), una del grupo *Eriopersicon* (*Solanum habrochaites* S. Knapp and D.M. Spooner) y una

del grupo *Arcanum* (*Solanum neorickii* D.M. Spooner, G.J. Anderson and R.K.Jansen)]; y, 20 accesiones de variedades comerciales de tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L.), provenientes de cinco países (Chile, Brasil, España, Francia y Holanda).

### **Análisis morfológico**

Dependiendo de la disponibilidad, entre dos y diez semillas (medios hermanos) de cada una de las accesiones, fueron germinadas en condiciones controladas bajo invernadero a 2134 msnm. Las plántulas con cuatro a cinco hojas verdaderas, fueron posteriormente trasplantadas a campo abierto en el Centro Binacional de Formación Técnica-Zapotepamba, provincia de Loja-Ecuador de la UNL, ubicado a 950 msnm, en la zona de vida Bosque muy seco Tropical (bms-T), con temperaturas entre 18 a 24° C y precipitación media anual de 600 mm.

En una área total de 1000 m<sup>2</sup> las plantas fueron sembradas en un diseño completamente aleatorizado a distancias de 1.0 x 1.5 m, bajo riego por goteo, sin fertilización, con tutorado.

De un total de 997 plantas, se raleó hasta dejar 723 plantas pertenecientes a 166 accesiones (en promedio 4 plantas por accesión), evaluándose cada carácter durante cinco meses.

Los caracteres morfológicos cuantitativos (20) y cualitativos (25), fueron medidos desde el inicio de la floración hasta el final del ciclo. Los caracteres fueron seleccionados de Rick (1983) y de observaciones personales que incluyeron caracteres de la planta en general, tallo, hojas, inflorescencias, frutos, plagas y enfermedades (tabla 1).

### **Evaluación de la resistencia a *Fusarium oxysporum***

El inóculo fue colectado en cultivares de tomate con síntomas de la enfermedad, en las principales zonas productoras de la provincia de Loja-Ecuador (Nangora, El Carmen, La Era, El Tambo y San Francisco). Las plantas enfermas fueron arrancadas de raíz, empacadas en papel húmedo y en plástico. El hongo fue aislado, purificado e identificado Barnett y Hunter (1972); Puhalla (1985); Nelson *et al.*, (1994) y posteriormente fue masificado en sustrato de arroz, incubándose a 25 °C durante 15 a 20 días, hasta que el micelio cubrió la superficie total del sustrato.

La caracterización e identificación del patógeno a nivel de género y especie se realizó en el laboratorio de Fitopatología de la UNL, mediante observaciones microscópicas y comparación con claves taxonómicas Leslie y Summerell (2006). Para obtener datos cruzados, réplicas de cada una de las cepas madre fueron analizadas en el laboratorio de fitopatología de la Agencia Ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del agro (AGROCALIDAD).

Paralelamente y bajo condiciones de invernadero, se germinaron tres semillas previamente desinfectadas (carboxín 0,3 %) y sometidas a imbibición con ácido giberélico (0,1 %) por 24 horas. Se utilizó un sustrato 1:2:1 (suelo:arena:humus) desinfectado químicamente con Captan 80 % y Carbofurán 20 %.

Posterior a la germinación, se raleó hasta dejar una plántula por accesión. Cuando las plántulas desarrollaron tres hojas verdaderas, se inoculó mediante inyección Okiror (1998), una suspensión conidial concentrada a 2x10<sup>6</sup> conidios/ml. Las plantas fueron mantenidas en baldes plásticos a 2134 msnm, a cielo abierto, con temperatura promedio de 16 ± 6° C, 800 mm de precipitación y humedad relativa de 60-70 %.

Debido a la ausencia de sintomatología con el método antes descrito, se realizó la inoculación por inmersión, en plántulas germinadas y raleadas bajo las condiciones antes descritas, en un sustrato de turba desinfectado con calor a 100° C. Cuando las plántulas desarrollaron tres hojas verdaderas, fueron inoculadas por inmersión con 200 ml de un macerado de raíces de plantas con síntomas de la enfermedad (200 g de raíces lavadas y desinfectadas para un volumen final de un litro de agua destilada). Las plantas fueron mantenidas bajo condiciones de invernadero, a temperatura diurna de 25 ± 1° C con diferencias de -8° C durante la noche, humedad relativa del 60 % y fotoperiodo de 10 horas por día.

Para ratificar los resultados obtenidos con el método antes descrito, se probó el método de inoculación en medio hidropónico, para lo cual, tres semillas por accesión fueron germinadas entre dos papeles filtro (sándwich) humedecido con una solución enriquecida con micro y macronutrientes. Siete días después de la germinación, se adicionaron 200 ml de inóculo (200 g de raíces lavadas y desinfectadas para un volumen final de un litro de agua destilada) y se mantuvieron en estufa bajo condiciones controladas: temperatura 28° C, humedad relativa 60% y luz artificial 200 lux (ciclo alternado: 12 horas luz-12 horas oscuridad).

La resistencia, tolerancia o susceptibilidad a *F. oxysporum*, se evaluó diariamente a partir del tercer día de inoculación. Según la sintomatología presentada y el avance de la enfermedad, se evaluó cada planta en escala del 1 al 3: Resistente (1) sin sintomatología; Tolerante (2) flácida o amarillamiento de hojas; y, Susceptible (3) muerte de la planta.

Porciones de raíz y cuello de las plantas muertas procedentes de los diferentes ensayos, fueron aisladas para ratificar que el agente causal de la sintomatología fuera efectivamente *F. oxysporum*.

### **Análisis estadístico**

Cada uno de los datos cuantitativos fue sometido al test de normalidad, y, al comprobar su incumplimiento, se realizó un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis, y se aplicó el test de comparación múltiple de Dunn's,



**Tabla 1.** Caracteres cuantitativos y cualitativos empleados para la caracterización morfológica de especies silvestres del género *Solanum* sección *Lycopersicon*.

Caracteres cuantitativos	Nomenclatura	Caracteres cualitativos	Nomenclatura
Altura de la planta (cm)	AP	Tipo de crecimiento (determinado, indeterminado)	TC
Diámetro del tallo principal (cm)	DTP	Volumen de follaje (pequeño, grande)	VF
Número de ramificaciones (presente, ausente)	NR	Forma del borde de la hoja (entero, dentado,)	FBOH
Distancia de entrenudos (cm)	DE	Forma de base de la hoja (abierta, cerrada)	FBAH
Ancho de la hoja (cm)	AH	Ápice de la hoja (agudo, acuminado)	AH
Longitud del nervio principal (cm)	LNP	Color de la hoja (verde claro, verde intenso)	CH
Longitud del pecíolo (cm)	LPEC	Tipo de inflorescencia (simple, bifurcada)	TI
Longitud de la inflorescencia (cm)	LI	Disposición de sépalos (gamosépalos, dialisépalos)	DS
Flores por inflorescencia (número)	NFI	Disposición de pétalos (gamosépalos, dialisépalos)	DP
Inflorescencias por planta (número)	NIP	Disposición del ovario (súpero, ínfero)	DO
Altura a la primera inflorescencia (mm)	API	Pistilo (exerto, inserto)	P
Longitud de sépalos (mm)	LS	Forma transversal del fruto (redondeada, irregular)	FTF
Longitud de pétalos (mm)	LPET	Forma longitudinal del fruto (aplastada, alargada)	FLF
Frutos por racimo (número)	NFR	Color de fruto inmaduro (verde claro, verde intenso)	CFI
Peso promedio de 20 frutos (g)	PPF	Color de fruto maduro (verde claro, rojo)	CFM
Lóculos por fruto (número)	NL	Color de la pulpa (verdosa, roja)	CP
Longitud del fruto (mm)	LF	Intensidad de hombros (ligero, mediano)	IH
Diámetro del fruto (mm)	DF	Acostillado (ausente, medio)	A
Frutos por planta (número)	NFP	Cicatriz peduncular (la tapa el cáliz, deprecia el fruto)	CP
Peso de campo (kg/planta)	PFC	Cicatriz estilar (apenas se ve, se aprecia muy claramente)	CE
		Áfidos (presente, ausente)	AF
		<i>Prodiplosis longifila</i> (presente, ausente)	LI
		<i>Meloidogyne</i> sp. (presente, ausente)	NE
		<i>Fusarium</i> sp. (presente, ausente)	FU
		<i>Oidium lycopersicum</i> (presente, ausente)	OI

mediante el paquete GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, California, USA), determinando las variables no correlacionadas. A los datos cuantitativos de medios hermanos se calculó la media aritmética y se generó un valor medio para cada accesión. Se realizó un análisis de clasificación de componentes principales y otro de coordenadas principales, mediante el paquete estadístico PAST (Hammer *et al.*, 2007).

Con las variables cualitativas se elaboró una matriz binaria y se obtuvo la moda de los datos de medios hermanos, generándose así un dato por cada accesión. Se realizó un análisis de agrupamiento por coordenadas principales a través del programa PAST (Hammer *et al.*, 2007).

Se estimaron las frecuencias relativas de las plantas resistentes, tolerantes y susceptibles a *F. oxysporum* para las diferentes especies, mediante una prueba de Chi cuadrado ( $X^2$ ) aleatorizada por el método de Monte Carlo para 1000 repeticiones, utilizando el programa CHIRXC (Zaykin y Pudovkin 1993).

## Resultados

### Análisis Morfológico

#### Caracteres cuantitativos

La evaluación del material vegetal, considerando las 45 variables descritas, permitieron estimar la variabilidad morfológica en las especies analizadas, donde se detectaron diferencias fenotípicas relacionadas con el fruto y las características vegetativas de las plantas, así como en los componentes del rendimiento.

Según se informa en la tabla 2, las variables cuantitativas que caracterizan morfológicamente la planta en general, muestran que *S. habrochaites* es la más diferenciada. Las variedades cultivadas son las de menor altura y tienen el menor número de ramificaciones, en comparación con *S. habrochaites* que presenta más del doble de ramificaciones, así como mayor cantidad

**Tabla 2.** Medias y su error estándar para las variables cuantitativas, en cuatro especies del género *Solanum*. Se muestran los valores por especie y variable cuantitativa. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). El significado de las abreviaturas se muestra en la tabla 1.

Variables	Especies				
	<i>S. l. var. cerasiforme</i>	<i>S. habrochaites</i>	<i>S. neorickii</i>	<i>S. pimpinellifolium</i>	<i>S. lycopersicum</i>
AP	147,43±2,357b	242,28±4,129a	150,17±2,448b	221,15±3,669 <sup>a</sup>	115,06±3,061c
DTP	8,75±0,134bc	8,84±0,075ab	7,36±0,150d	8,24±0,108c	9,70±0,249a
DE	6,24±0,164c	9,40±0,097a	6,03±0,098c	7,07±0,074b	6,36±0,109c
NR	9,51±0,230c	15,03±0,232a	14,42±0,429ab	12,85±0,233b	6,17±0,266d
AH	8,46±0,155b	12,70±0,116a	6,21±0,109d	7,42±0,115c	12,48±0,498a
LNP	16,68±0,236b	21,95±0,212a	11,29±0,196d	13,60±0,219c	23,65±0,636a
LPEC	3,12±0,080b	3,86±0,045a	2,04±0,078d	2,74±0,065c	4,29±0,174a
LPET	1,00±0,010c	1,37±0,009a	0,77±0,008d	1,08±0,017b	1,07±0,021bc
LS	0,74±0,009c	0,80±0,010b	0,47±0,006d	0,48±0,006d	0,92±0,022a
API	32,38±0,492b	49,45±0,555a	30,03±1,022b	23,52±0,436c	30,83±0,821b
LI	9,55±0,135b	11,20±0,159a	8,70±0,187bc	10,60±0,145 <sup>a</sup>	8,20±0,267c
NFI	7,22±0,136c	16,81±0,198a	7,41±0,138c	9,24±0,109b	5,52±0,235d
NIP	57,63±1,761c	104,41±2,562b	150,89±8,465a	153,93±5,530a	22,75±0,828d
NFP	151,27±5,010c	558,00±16,645a	422,45±22,485a	300,04±14,754b	40,64±4,405d
NFR	4,51±0,097b	8,86±0,150a	4,72±0,129b	3,78±0,099c	2,73±0,240d
LF	21,30±0,217b	10,65±0,072c	8,43±0,057d	10,64±0,087c	54,78±2,184a
DF	24,21±0,288b	10,55±0,071d	8,96±0,063e	11,41±0,097c	53,39±2,264a
NL	2,39±0,038b	2,00±0,000c	2,00±0,000d	2,00±0,000cd	3,50±0,175a
PFC	1,55±0,054b	0,76±0,024c	0,33±0,017d	0,49±0,029d	3,36±0,256a
PPF	223,86±7,710b	27,62±0,423c	16,32±0,267d	31,76±0,714c	2592,00±203,993a

de frutos por racimo, frutos por planta y mayor tamaño de la planta.

Las distancias de entrenudos son mayores en *S. habrochaites*; mientras que en *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, *S. neorickii* y en las variedades cultivadas, estos son más cortos y no hay diferencias significativas entre estas especies.

Las variables que caracterizan morfológicamente la hoja, muestran diferencias significativas para *S. neorickii*, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* y *S. pimpinellifolium*.

*S. habrochaites* presenta pétalos de mayor longitud, mientras que los más pequeños se encuentran en *S. neorickii*, que a su vez posee los sépalos más pequeños, al igual que *S. pimpinellifolium*, ya que el resto los duplican en tamaño.

*S. pimpinellifolium* presenta la primera inflorescencia a menor altura con respecto al suelo, en relación al resto de especies, sin embargo *S. habrochaites* la presenta al doble de altura. La inflorescencia de estas dos especies es también más larga y muestran el más alto número de flores por inflorescencia, en contraste con las variedades cultivadas que presentan valores menores.

*S. neorickii* y *S. pimpinellifolium* producen la mayor cantidad de inflorescencias por planta y se diferencian significativamente de las variedades cultivadas, quienes producen una cantidad reducida tanto de flores por inflorescencia como de frutos por racimo. Sin embargo, *S. habrochaites* presenta el doble de frutos por racimo, en relación a las dos especies silvestres antes mencionadas.

Las variables para caracterizar morfológicamente el tamaño del fruto y el rendimiento, muestran diferencias no significativas entre *S. habrochaites* y *S. pimpinellifolium*, mientras que el resto de las especies son diferentes. El diámetro del fruto, varía significativamente en todas las especies.

La matriz de correlación generada por comparación de las medias de las variables cuantitativas, muestra que las variables que caracterizan la hoja (ancho de la hoja, longitud del nervio principal, longitud del pecíolo) están alta y significativamente correlacionadas, al igual que aquellas que caracterizan el fruto (número de lóculos, longitud del fruto, diámetro del fruto, peso de frutos en campo, número de flores por planta). Sin embargo, las variables cuantitativas que caracterizan la planta en general (altura de la planta, diámetro del tallo principal), muestran muy baja correlación con

aquellas que caracterizan la hoja y la inflorescencia (longitud de la nervadura principal, longitud del pecíolo, longitud de sépalos, altura a la primera inflorescencia). De igual manera, las variables que caracterizaron la hoja (ancho de la hoja, longitud del nervio principal, longitud de pecíolo), están correlacionadas con valores bajos, respecto de aquellas que caracterizaron la inflorescencia, el fruto y el rendimiento (longitud de la inflorescencia, número de frutos por planta, número de lóculos, longitud del fruto, diámetro del fruto, número de frutos por inflorescencia, número de frutos por planta, número de frutos por racimo, peso promedio de 20 frutos).

Los caracteres no correlacionados fueron: longitud de la inflorescencia y altura a la primera inflorescencia; y, los correlacionados con un valor inferior a 0.7 fueron: diámetro del tallo principal, distancia de entrenudos, número de flores por inflorescencia, número de inflorescencias por planta, longitud de sépalos, longitud de pétalos, número de frutos por racimo, número de lóculos por fruto. Las relaciones entre las especies, construidas con las variables no correlacionadas se muestran en la figura 1 (A y B).

Los análisis de componentes y coordenadas principales, realizados con la media de los medios hermanos para los datos cuantitativos (figura 1, A y B) separaron únicamente a *S. habrochaites*, el cual forma un conglomerado bien diferenciado, mientras que las especies restantes se encuentran muy relacionadas morfológicamente.

### Caracteres cualitativos

De un total de 24 variables cualitativas analizadas, siete de ellas fueron monomórficas para todas las especies silvestres y las variedades cultivadas; así, todas presentaron la base de la hoja en forma abierta, el ápice de la hoja en forma aguda, tanto la disposición de sépalos como de pétalos fue gamosépala, la disposición del

ovario súpero, todos los frutos inmaduros fueron de color verde claro; y, la cicatriz peduncular se observó siempre tapada por el cáliz.

Para las variables cualitativas restantes que presentaron diferentes categorías, se calcularon sus frecuencias relativas para cada una de las especies, así como se estimó el valor de chi cuadrado ( $\chi^2$ ) y su probabilidad, los cuales resultaron diferentes para todas las variables (tabla 3).

Las variedades cultivadas (*S. lycopersicum*) presentan un tipo de crecimiento determinado, y en menor frecuencia lo presenta también *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, mientras que el resto de especies silvestres, son de tipo indeterminado.

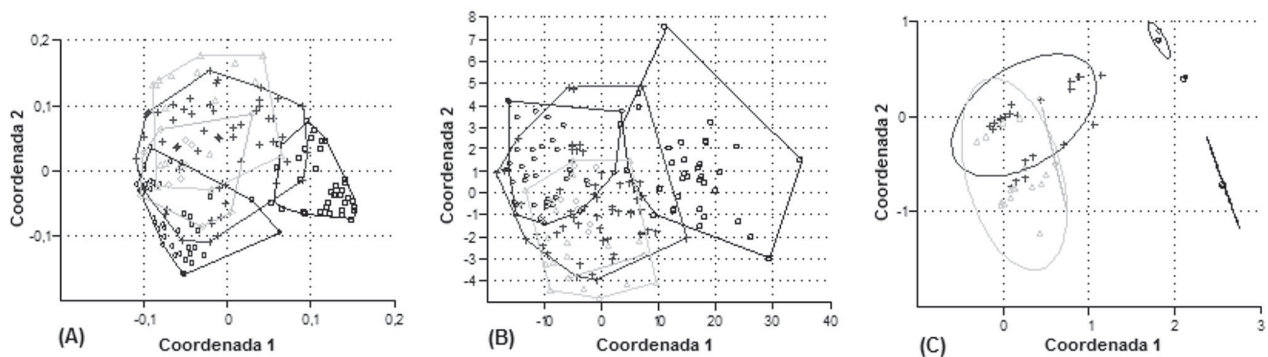
*S. neorickii* y *S. lycopersicum* presentan el follaje más pequeño, mientras que todas las plantas de *S. habrochaites* se destacaron por presentar follaje grande.

Todas las especies mostraron el borde de la hoja dentado y el color de la hoja verde intenso, mientras que la variedad *cerasiforme* y la mayoría de *S. pimpinellifolium* tienen el borde entero (85 %) y color verde claro (100 %).

En general, todas las especies presentan un tipo de ramificación de la inflorescencia simple, diferenciándose únicamente *S. habrochaites* con su inflorescencia de tipo bifurcada y su pistilo exerto, mientras que las especies restantes presentan pistilos insertos.

En las especies silvestres se encuentran más frecuentemente frutos con forma redonda, tanto en el corte transversal como en el longitudinal, mientras que *S. lycopersicum* es de forma redonda y alargada y *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* redonda y aplastada.

Todos los frutos maduros de *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* son rojos, mientras que el color naranja lo presentan con mayor frecuencia *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*. Los frutos maduros de *S. habrochaites* y *S. neorickii* son de color verde claro, al igual que su pulpa.



**Figura 1.** Análisis de agrupamiento para los datos morfológicos de 166 accesiones pertenecientes a cinco especies silvestres del género *Solanum* sección *Lycopersicon*: *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (+), *S. habrochaites* (□ negro), *S. neorickii* (◇ gris), *S. pimpinellifolium* (◇ negro) y *S. lycopersicum* (Δ gris). (A) Coordenadas principales datos cuantitativos. (B) Componentes principales datos cuantitativos. (C) Componentes principales datos cualitativos, generados con el programa PAST (Hammer *et al.*, 2007).

**Tabla 3.** Frecuencias de las variables cualitativas por categoría, en especies del género *Solanum*. Valores de  $\chi^2$  y su probabilidad (p).

Variables	Categoría	<i>S. l. var. cerasiforme</i> N=228	<i>S. habrochaïtes</i> N=208	<i>S. neorickii</i> N=76	<i>S. pimpinellifolium</i> N=147	<i>S. lycopersicum</i> N=64	$\chi^2$ (p)
Tipo de Crecimiento	Determinado	0.292	0.000	0.000	0.000	0.708	9.488 (0)
	Indeterminado	0.318	0.316	0.116	0.223	0.027	
Volumen de follaje	Pequeño	0.090	0.000	0.623	0.000	0.287	15.507 (0)
	Medio	0.554	0.000	0.000	0.371	0.076	
	Grande	0.023	0.954	0.000	0.023	0.000	
Forma del borde de la hoja	Entero	0.312	0.000	0.000	0.688	0.000	9.488 (0)
	Dentado	0.315	0.301	0.110	0.181	0.093	
Color de la hoja	Verde claro	0.552	0.010	0.010	0.376	0.051	9.488 (0)
	Verde Intenso	0.036	0.614	0.217	0.000	0.133	
Tipo de Inflorescencia	R Simple	0.427	0.008	0.153	0.296	0.117	9.488 (0)
	R Bifurcado	0.071	0.903	0.000	0.000	0.027	
Pistilo	Exerto	0.042	0.550	0.201	0.196	0.011	15.507 (0)
	Normal	0.571	0.000	0.000	0.265	0.164	
	Inserto	0.786	0.000	0.000	0.000	0.214	
Forma Transversal	Redondo	0.319	0.278	0.108	0.204	0.091	9.488 (0.004)
	Irregular	0.190	0.619	0.000	0.190	0.000	
Forma Longitudinal	Aplastado	0.754	0.000	0.000	0.058	0.188	15.507 (0)
	Redondeado	0.286	0.338	0.123	0.232	0.021	
	Alargado	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	
Color del fruto maduro	Verde claro	0.000	0.732	0.268	0.000	0.000	15.507 (0)
	Naranja	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	Rojo	0.508	0.000	0.000	0.343	0.149	
Color de la pulpa	Verdoso	0.000	0.732	0.268	0.000	0.000	15.507 (0)
	Amarillo	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	Rojo	0.508	0.000	0.000	0.343	0.149	
Intensidad de hombros	Sin hombros	0.313	0.299	0.109	0.211	0.068	15.507 (0)
	Ligero marcado	0.556	0.000	0.000	0.000	0.444	
	Mediano marcado	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	
Acostillado	Ausente	0.306	0.303	0.111	0.214	0.067	15.507 (0)
	Ligero	0.581	0.000	0.000	0.000	0.419	
	Medio	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	
Cicatriz Estilar	Apenas se nota	0.310	0.305	0.112	0.216	0.057	9.488 (0)
	Aprecia claramente	0.405	0.000	0.000	0.000	0.595	
Áfidos	Presente	0.134	0.403	0.147	0.285	0.031	9.488 (0)
	Ausente	0.768	0.000	0.000	0.000	0.232	
<i>Prodiplosis longifila</i>	Presente	0.085	0.536	0.000	0.379	0.000	9.488 (0)
	Ausente	0.582	0.000	0.227	0.000	0.191	
<i>Meloidogyne</i> sp.	Presente	0.011	0.579	0.000	0.409	0.000	9.488 (0)
	Ausente	0.615	0.000	0.209	0.000	0.176	
<i>Fusarium</i> sp.	Presente	0.000	0.586	0.000	0.414	0.000	9.488 (0)
	Ausente	0.620	0.000	0.207	0.000	0.174	
<i>Oidium lycopersicum</i>	Presente	0.025	0.571	0.000	0.404	0.000	9.488 (0)
	Ausente	0.610	0.000	0.212	0.000	0.178	



La intensidad de hombros y acostillado de los frutos de *S. lycopersicum* es media, en *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ligera; y, el resto de especies silvestres mostraron ausencia para éstas dos variables.

La cicatriz estilar apenas se nota en *S. neorickii*, *S. habrochaites* y *S. pimpinellifolium*, mientras que en las restantes se aprecia claramente.

Finalmente los áfidos estuvieron presentes en todas las plantas de todas las especies, presentándose en menor frecuencia únicamente en *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (30,26 % de las plantas).

*Prodiplosis longifila* (liendrilla) y *Oidium lycopersicum* (oidio) no estuvieron presentes en *S. neorickii* ni *S. lycopersicum*. Sin embargo todas las plantas de *S. habrochaites* y *S. pimpinellifolium* estuvieron infectadas.

*S. lycopersicum* y las especies silvestres *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, y *S. neorickii* no presentaron incidencia de *Fusarium* sp. ni *Meloidogyne* sp.; sin embargo todas las plantas de *S. habrochaites* y *S. pimpinellifolium* fueron infectadas por los dos patógenos.

Las relaciones entre las especies, construidas sobre la base de presencia y ausencia de las variables cualitativas analizadas mediante componentes principales, separa dos especies del resto: *S. habrochaites* y *S. pimpinellifolium* y se muestran en la figura 1 (C).

### Evaluación de la resistencia a *Fusarium oxysporum*

Con las plantas colectadas con síntomas de la enfermedad, provenientes de cinco localidades de la provincia de Loja, se realizaron dos aislamientos por sector, para un total de diez. Todos los aislados fueron identificados dentro del género *Fusarium*, especie *oxysporum*, en base a sus características coloniales a nivel macroscópico (forma del micelio y color) y microscópico (morfología de conidias) (figura 2).

A nivel macroscópico, el micelio joven presentó un aspecto transparente incoloro, posteriormente tornó hacia un color crema; y, finalmente adquirió una tonalidad púrpura, acorde a lo descrito por Agrios (2007).

Con la inoculación por inyección, los primeros síntomas observables se presentaron 15 días post inoculación; de forma generalizada para las cinco especies se inició con un leve marchitamiento, seguido de amarillamiento en las hojas bajas, hasta que alrededor del día 32 se produjo una ligera defoliación de las hojas más bajas, acompañada de marchitamiento generalizado de la planta en las horas más calurosas, recuperándose lentamente hacia el final del día, sin producir la muerte de ninguna planta.

Además de los síntomas antes mencionados, algunas plantas presentaron un halo oscuro en la zona de inyección; sin embargo ninguna de ellas llegó a morir, categorizándose en total como resistentes el 47 % de

las plantas y como tolerantes el 53 %. A nivel de especie, *S. habrochaites* presentó la mayor cantidad de plantas resistentes (133 entre 209 plantas), *S. neorickii* de plantas tolerantes (48 entre 76); mientras que por el contrario, las variedades cultivadas de *S. lycopersicum* fueron las menos resistentes (13 entre 77 plantas).

Con la inoculación por inmersión, los primeros síntomas se observaron a partir del día 10 posterior a la inoculación, con similar sintomatología a la descrita anteriormente; sin embargo a partir del día 17, un elevado número de plantas desarrolló síntomas de mayor gravedad. Se observaron chancros a nivel de cuello y raíz principal, contabilizando el 57,8 % de plantas susceptibles que terminaron muriendo, y, el 34,2 % resistentes; las restantes se categorizaron como tolerantes. A nivel de especie, la mayoría de las plantas de *S. lycopersicum* fueron susceptibles (66 entre 77 plantas), mientras que la mayor resistencia se observó en *S. habrochaites* (150 entre 209 plantas).

Para la inoculación bajo hidroponía, entre los 5 y 8 días posteriores a la inoculación, se observaron los primeros síntomas que incluyeron marchitez y amarillamiento generalizados. Estos aumentaron exponencialmente, hasta que finalmente entre los días 12 y 20 se produjo la muerte de la mayoría de plantas.

La reacción de la patogenicidad fue rápida para éste método, en el que se produjo una generalizada colonización del hospedante en los haces vasculares del hospedero, que llevó a la obstrucción del xilema, necrosis a nivel de cuello y muerte de las plantas.

El 78,9 % del total de las plantas fueron susceptibles, mientras que el 13,7 % resultaron tolerantes y solamente el 7,4 % fueron resistentes. La mayor frecuencia de plantas resistentes resultaron pertenecer a *S. pimpinellifolium* (16 entre 147 plantas), *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (26 entre 242) y *S. neorickii* (8 entre 76 plantas), mientras que ninguna planta de *S. lycopersicum* sobrevivió. La mayor frecuencia de plantas tolerantes correspondieron a *S. neorickii* y *S. habrochaites* (16 entre 76 y 44 entre 209 plantas, respectivamente).

Por lo antes mencionado, el método hidropónico fue más eficaz y rápido y por tanto el más adecuado para la evaluación de material vegetal a la patogenicidad de *Fusarium oxysporum*.

A nivel de especie, entre el 68 y el 78 % de las plantas pertenecientes a las especies silvestres fueron susceptibles, sin embargo las variedades cultivadas resultaron susceptibles en un 97,4 %, las cuales terminaron muriendo en su totalidad (tabla 4).

Las frecuencias más altas y a su vez similares de plantas resistentes se observaron en *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, *S. neorickii* y *S. pimpinellifolium*. De igual manera, comparten frecuencias de plantas más tolerantes *S. habrochaites* y *S. neorickii* (tabla 4).

**Tabla 4.** Frecuencia relativa de plantas resistentes, tolerantes o susceptibles a *Fusarium oxysporum*, para la inoculación mediante hidroponía, en cuatro especies silvestres del género *Solanum* sección *Lycopersicon*, y algunas variedades comerciales de tomate de mesa. Se muestran los valores de  $\chi^2$  y su probabilidad (p).

Especies	N	Resistentes	Tolerantes	Susceptibles	$\chi^2$ (p)
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	228	0.107	0.107	0.785	15.507 (0)
<i>S. habrochaites</i>	76	0.048	0.211	0.742	
<i>S. lycopersicum</i>	147	0.000	0.026	0.974	
<i>S. neorickii</i>	64	0.105	0.211	0.684	
<i>S. pimpinellifolium</i>	208	0.109	0.129	0.762	

Las colectas de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* de Loja y de Ica (Perú) presentaron mortalidad en todas las plantas, mientras que las de Morona Santiago resultaron ser las más resistentes.

En cuanto a las colectas de *S. pimpinellifolium*, Carchi y Esmeraldas fueron en su totalidad susceptibles, mientras que las colectas peruanas, seguidas de Imbabura y Manabí resultaron más frecuentemente resistentes. Las plantas de Galápagos fueron las más tolerantes (tabla 5).

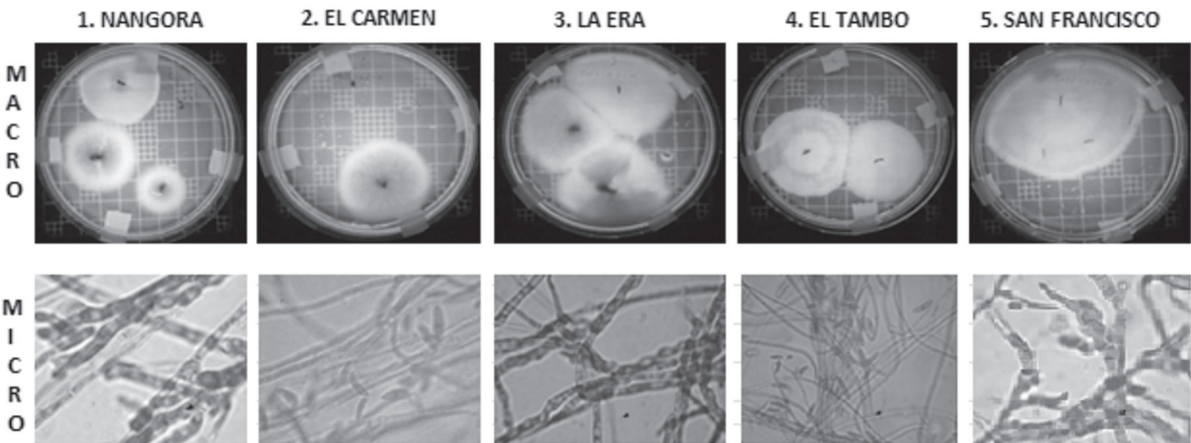
**Discusión**

Todas las especies silvestres de tomate son nativas del oeste de Sur América y están distribuidas desde Ecuador central, a través del Perú hasta el norte de Chile, incluyendo las Islas Galápagos (Darwin *et al.*, 2003). Estas plantas crecen en una gran variedad de hábitats, desde el nivel del mar en la costa árida del Pacífico, hasta sobre los 3300 msnm en numerosos valles del lado oeste de los Andes (Rick 1973; Taylor 1986).

El Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, en colaboración con el Parque Nacional

de Galápagos, la Universidad Nacional de Piura, la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (Lambayeque, Perú), y el Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), ejecutaron varias colectas de especies silvestres del género *Solanum*, desde su hábitat natural. Esta colección incluye una gran cantidad de accesiones ecuatorianas, que han sido tradicionalmente subrepresentadas en estudios previos Rick *et al.*, (1977); Caicedo y Schaal (2004); Sifres *et al.*, (2010) y que han mostrado diferencia en relación a las accesiones colectadas en territorio peruano (Zuriaga *et al.*, 2009).

El presente trabajo incluyó entre 76 y 228 individuos de cada una de las cuatro especies silvestres colectadas en su hábitat natural en territorio ecuatoriano, cuya caracterización morfológica permitió examinar la variabilidad existente entre las especies analizadas. Se detectaron diferencias fenotípicas relacionadas con el fruto, el rendimiento, y las características vegetativas de las plantas.



**Figura 2.** Aislados de *Fusarium oxysporum* a partir de raíz y cuello de plantas con síntomas de la enfermedad, provenientes de las principales zonas productoras de Loja y Catamayo (Nangora, El Carmen, La Era, El Tambo, San Francisco). En la fila superior se observan las estructuras a nivel macroscópico, mientras que en la inferior se pueden ver las estructuras a nivel microscópico.

Las variables morfológicas, muestran que *S. habrochaites* es la especie más diferenciada con relación a las otras analizadas. Dicha especie desarrolla plantas más altas, con mayor follaje, distancias de entrenudos más largas, el doble de altura a la primera inflorescencia y más del doble de ramificaciones. Las plantas de esta especie producen inflorescencias más largas, con mayor cantidad de flores por inflorescencia, frutos por racimo y de frutos por planta. Estos resultados son concordantes con los reportados por Peralta et al. (2008), quienes señalan que esta especie es fácil de distinguir del resto de las especies silvestres de tomate. Plantas más altas, muy robustas y pubescentes caracterizan a *S. habrochaites* (Peralta y Spooner 2005).

*S. neorickii* produce un alto número de frutos por planta (segundo después de *S. habrochaites*), sin embargo el peso total de los frutos por planta es el menor de todos, debido a que su fruto es el más pequeño, así como también su follaje, hojas y flores. Los resultados antes mencionados son coincidentes con la caracterización previa de la especie en que se informa que en general *S. neorickii* puede ser reconocido por sus pequeñas flores e inflorescencias y por su alto número de flores y plantas menos robustas Peralta et al. (2008), presentando las partes florales más pequeñas y estigmas incluidos en el tubo de la antera (Peralta y Spooner 2005).

Las variedades cultivadas (*S. lycopersicum*) presentan un tipo de crecimiento determinado, y en menor frecuencia lo presenta también *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, mientras que el resto de especies silvestres, son de tipo indeterminado, situación que coincide con

lo previamente descrito por Nuez (1995), para estas especies silvestres.

*S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* están estrechamente relacionadas, sugiriendo un reciente origen y rápida diferenciación morfológica (Peralta y Spooner 2001). *S. pimpinellifolium* puede ser diferenciada por el tipo de flor (Darwin et al., 2003). En los individuos analizados, los pétalos de *S. pimpinellifolium* tienen la misma longitud que los de *S. lycopersicum*, sin embargo los sépalos tienen la mitad de longitud al igual que las de sus congénicas silvestres, variable que permite diferenciar la especie.

Un estudio de accesiones peruanas encuentra que *S. pimpinellifolium* está muy estrechamente relacionada con *S. lycopersicum*, con la cual hibrida libremente y su identificación puede ser problemática debido a la introgresión mutua de genes, lo cual requiere el uso de caracteres diagnóstico para identificar a *S. pimpinellifolium* (Peralta et al., 2008). Sin embargo, las poblaciones autógamas de *S. pimpinellifolium* tienen flores más pequeñas que aquellas alógamas, producto de entrecruzamiento (Georgiady y Lord 2002). Los genotipos alógamos de *S. habrochaites*, *S. pennellii*, y *S. pimpinellifolium*, también despliegan caracteres de atracción para la polinización. Corolas más largas, amarillo brillante, anteras curvadas y asimétricas y estilos exsertos son características que probablemente se correlacionan con las altas tasas de cruzamiento interespecífico encontrado en *S. peruvianum* (Rick et al., 1977).

Las variables morfológicas cuantitativas permiten en general diferenciar las especies más eficazmente que

**Tabla 5.** Frecuencia relativa de plantas resistentes, tolerantes o susceptibles a *Fusarium oxysporum*, para las diferentes localidades de colecta de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* y *S. pimpinellifolium*. Se muestran los valores de  $\chi^2$  y su probabilidad (p). Método hidropónico.

Especie	Localidad	N	Resistente	Tolerante	Susceptible	$\chi^2$ (p)
<i>S. l.</i> var. <i>cerasiforme</i>	Galápagos	13	0.000	0.154	0.846	21.026 (0.175)
	Morona	49	0.224	0.143	0.633	
	Zamora	140	0.100	0.107	0.793	
	Loja	8	0.000	0.000	1.000	
	Napo	12	0.083	0.083	0.833	
	Ica	10	0.000	0.000	1.000	
	Oro	10	0.000	0.100	0.900	
<i>S. pimpinellifolium</i>	Galápagos	18	0.111	0.222	0.667	23.685 (0.376)
	Perú	21	0.238	0.095	0.667	
	Imbabura	13	0.154	0.154	0.692	
	Loja	20	0.050	0.100	0.850	
	Manabí	32	0.156	0.156	0.688	
	Oro	23	0.043	0.174	0.783	
	Carchi	9	0.000	0.000	1.000	
	Esmeraldas	12	0.000	0.000	1.000	

las variables cualitativas, no obstante la importancia de aquellas relacionadas con el tamaño y color del fruto, así como el tamaño y posición de los componentes florales Garzón (2011), que constituyen el primer medio para definir la especie en campo.

En este estudio se ratificó la resistencia, tolerancia o susceptibilidad a *F. oxysporum* de cada una de las plantas, mediante tres procedimientos distintos.

La inoculación por inyección a la planta con suspensión conidial, producto del aislamiento y masificación del hongo causó una leve sintomatología y ninguna mortalidad, sin embargo esto es en extremo inconcebible, dada la agresividad del hongo, quien en estado de plántula causa la muerte masiva de individuos. La pérdida de la virulencia del patógeno por el proceso de aislamiento pudo haber sido la causa principal, agravada por la falta de condiciones climáticas para el desarrollo del hongo, ya que las plantas se mantuvieron en baldes plásticos a cielo abierto. En general, con este método se observaron marchitez, amarillamiento y decoloración del xilema. Resultados similares reporta Velásquez et al. (2002) en un estudio realizado en frijol (*Phaseolus vulgaris*) inoculado con *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, atribuyéndole tales síntomas a la variación de temperatura entre el suelo (16-26° C) y la del aire (21-32° C), cuya oscilación pudo haber afectado la expresión de síntomas, así como la extensión de la decoloración del xilema.

En los otros dos métodos de inoculación ensayados no se empleó el hongo aislado, y de esta forma se descartó la posibilidad de pérdida de virulencia del patógeno. El macerado de raíces de plantas con síntomas de la enfermedad provenientes de campos infestados, causaron la muerte de un considerable número de plantas, tanto por el método de inmersión como el de hidroponía. Sintomatología similar se ha observado en tabaco (*Nicotiana tabacum*) inoculado con *F. oxysporum* f. sp. *nicotinae*, en las que los síntomas de marchitez, amarillamiento y muerte eventual de hojas se asociaron con el rápido movimiento del hongo a través de la planta Mueller y Morgham (1996), de manera que la expresión de síntomas foliares estuvo relacionada con la infección de los pecíolos (Gao et al., 1995).

La inoculación en condiciones de hidroponía sirvió para confirmar los resultados, ya que permitió incluir los 723 individuos al mismo tiempo en las mismas condiciones estrictamente controladas para el desarrollo del hongo. El inóculo en estas condiciones, presenta un micelio con los cuerpos fructíferos del hongo Carrillo (2003) y su desarrollo e infección se garantiza con las condiciones controladas específicamente para ello.

La caracterización morfológica de los aislados de las plantas muertas provenientes de los métodos evaluados, fueron coincidentes con las estructuras morfológicas de *Fusarium oxysporum*, tanto en el laboratorio de fisiología vegetal de la UNL, como en el laboratorio de

AGROCALIDAD, lo cual garantizó que la muerte de las plantas fue producida por el hongo en cuestión. Según Obreque y Mabel (2004), el color de las colonias en medio PDA varía a medida que el cultivo envejece, así, en los cultivos jóvenes una tonalidad rosa pálida, y los más envejecidos con una coloración púrpura, estos se presentan coincidente con lo observado en este estudio.

En todos los casos, a nivel microscópico se observaron microconidias con su forma redonda típica, constituidas por una o dos células; y, las macroconidias en forma de media luna, integradas por tres a cinco células, coincidentes con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1972) y con lo descrito por Agrios (1998), para estructuras propias de *F. oxysporum*. Tales circunstancias permitieron determinar sin lugar a dudas, que las plantas sobrevivientes y tolerantes poseen un genotipo particular que determina esa característica.

Todas las especies fueron significativamente diferentes en los niveles de resistencia, tolerancia o susceptibilidad al hongo, observándose una mortalidad generalizada. Sin embargo, *S. habrochaites* y *S. neorickii* presentaron mayor frecuencia de plantas tolerantes, respecto de las especies restantes.

En el estudio se consideraron entre 2 y 7 individuos de una misma accesión (medios hermanos), de los cuales la mayoría murieron durante los tres primeros días, otros resistieron al ataque del parásito y después de 20 días murieron; y, finalmente una gran minoría venció el poder patógeno de *F. oxysporum*, presentando gran vitalidad a los 20 días post inoculación. Esta situación es consistente en el caso de un carácter controlado por varios genes donde cada uno de ellos tiene una función, sea complementaria o diferente, pero cada uno aportando a la tolerancia o a la resistencia; favorecida por la alogamia que presentan las especies silvestres, lo cual genera una alta heterocigosidad y por tanto genes en segregación entre los medios hermanos.

Esta situación nos permite plantear la hipótesis de que hay varios genes responsables de la resistencia a *F. oxysporum* y a sus distintas razas fisiológicas, las cuales actualmente no están bien determinadas en el caso de Ecuador, donde su condición topográfica y variados climas, permiten seleccionar nuevas mutaciones en los seres vivos, incluyendo los parásitos. Sería necesario en el futuro definir cuáles son esos genes de resistencia y cuáles los genes del patógeno que están en juego.

## Conclusiones

Los caracteres morfológicos cuantitativos y cualitativos analizados en las especies *Solanum pimpinellifolium*, *S. neorickii*, *S. habrochaites*, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* en su conjunto, sólo diferencian a la especie *S. habrochaites*.

Entre las especies evaluadas la más resistente y tolerante a *Fusarium oxysporum* fue *Solanum neorickii*,



seguida de *S. pimpinellifolium*, y *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*. Todas las accesiones de las variedades cultivadas (*S. lycopersicum*) fueron susceptibles a *Fusarium oxysporum*.

## Recomendación

Se recomienda el empleo de marcadores moleculares para comparar las especies silvestres de tomate *Solanum pimpinellifolium*, *S. neorickii*, *S. habrochaetes*, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*.

Se recomienda el empleo de *Solanum neorickii* como progenitor, para programas de cruzamiento interespecíficos, que permitan la generación y selección de híbridos con resistencia y tolerancia a *Fusarium oxysporum*.

## Referencias bibliográficas

- Agrios, G.N. 1998. *Fitopatología*. México D.F: Limusa, p. 67-91, 93-107, 109-125, 425 - 427, 444.
- Agrios, G.N. 2007. Plant Pathology, 5e. San Diego, California, Elsevier (A Division of Reed Elsevier India Pvt. Limited): *Academic Press*. p. 238.
- Barnet, H.L., y Hunter, B.B. 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Burgess Publishing Company. Minneapolis. Minnesota, USA. p. 241.
- Bernal, H; Correa, J. 1990. Especies promisorias vegetales de los países del Convenio Andrés Bello. Tomo IV. SECAB Ciencia y Tecnología. pp. 149-322.
- Bosland, P.1988. *Fusarium oxysporum* a pathogen of many plant species. *Advances in plant pathology*. 6: 281-289.
- Caicedo, A.L. Schaal, B.A. 2004. Heterogeneous evolutionary processes affect R gene diversity in natural populations of *Solanum pimpinellifolium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 17444-17449.
- Carrillo L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta ISBN 987-9381-19.
- Darwin C. S.; Knapp S.; Peralta E. I. 2003. Taxonomy of tomatoes in the Galápagos Islands: native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (Solanaceae). *Systematics and Biodiversity*. 1 (1): 29-53.
- Gao, H.; Beckman, C.H.; Mueller, W. C. 1995. The role of vascular colonization as a measure of the genotypic interaction between various cultivars of tomato and various former or races of *Fusarium oxysporum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 46: 29-43.
- Garzón, J.P. 2011. Caracterización y evaluación morfoagronómica de la colección de tomate tipo cherry de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Tesis Magister en Ciencias Agrarias. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Palmira. 35-4456.
- Georgiadis, M. S. y Lord, M. 2002. Evolution of the inbred form in the currant tomato, *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Int. J. Plant Sci.* 163: 531-541.
- Hammer, O., D. A. T. Harper y P. D. Ryan. 2007. PAST- Paleontological Statistics software package. ver. 1.75.
- Hartman, J.R.; Fletcher, J.J. 1991. *Fusarium* crown and root rot of tomatoes in the U.K. *Plant Pathology*. 40:85-92.
- INIAP. 2001. Proyecto diagnóstico, biotecnología y manejo sostenible de la negrita *Prodidiplosis longifolia* en el Ecuador. Informe anual. Convenio. INIAP-PROMSA - CEDEGE. Departamento Nacional de protección vegetal. Sección Entomología. Estación Experimental Portoviejo. Ecuador. p. 13.
- Jarvis, W.R. 1988. *Fusarium* crown and root rot of tomatoes. *Phytoprotection*. 69:49-64.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing: Iowa, USA.
- Mueller, W.C.; Morgham, A.T. 1996. Ultrastructure of the vascular responses of tobacco to *Fusarium oxysporum* f. sp. *nicotianae*. *Canadian Journal of Botany*.74: 1273-1278.
- Nelson, P.E., Digman, M.C., y Anaissie, E.J. 1994. Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of *Fusarium* Species. *Clinical Microbiology Reviews*. 7: 479-504.
- Nuez, F.1995. El Cultivo del Tomate, obra colectiva. España. Ediciones Mundi Prensa, p. 27-28, 65-67.
- Obreque D., Mabel X. 2004. Evaluación de aplicaciones preinfección del fungicida Benomilo y del Bicontrolador *Trichoderma harzianum* en el control de *Fusarium* sp. en proteáceas. Universidad de Talca-Chile. p. 96.
- Okiror, M.A. 1998. Screening techniques for *Fusarium* wilt of pigeon pea. *African Crop Science Journal*. 1021-9730, p. 345-350.
- Peralta, I.; Spooner, D.M. 2001. Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. Subsection *Lycopersicon*). *American Journal of Botany*. 88: 1888-1902.
- Peralta, I.E. y Spooner, D.M. 2005. Morphological characterization and relationships of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon*) Monogr. Syst. Bot. *Missouri Bot Gard*. 104: 227-257.
- Peralta, I.E., Knapp, S. y Spooner, D.M. 2006. (en línea). Nomenclature for wild and cultivated tomatoes (Vol. 26). University of Wisconsin. <http://ddr.nal.usda.gov/bitstream/10113/2773/1/IND43943768> (consulta: 18 de noviembre 2012).
- Peralta, I.E.; Spooner, D.M. y Napp, S. 2008. The Taxonomy of tomatoes: a revision of wild tomatoes (*Solanum* L. section *lycopersicon*) and their outgroup relatives in sections *juglandifolium* and *lycopersicoides*. *Syst. Bot. Monogr.* 84: 1-186.
- Puhalla, J.E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Phytopathology*. 63: 179-183.
- Rick, C.M. 1973. Potential genetic resources in tomato species: Clues from observations in native habitats. Genes, Enzymes, and Populations. Plenum, New York, pp. 255-269.
- Rick, C.M., Fobes, J.F. y Holle, M. 1977. Genetic variation in *Lycopersicon pimpinellifolium*: Evidence of evolutionary change in mating systems. *Plant Systematics and Evol.* 127: 139-170.
- Rick, C.M. 1983. Genetic variation and evolution of Galápagos tomatoes. In Bowman, R.L., Berson, M. & Leviton, A.E. (eds), *Patterns of Evolution in Galápagos Organisms*. Pacific Division, AAAS, San Francisco, California. pp. 97-106.
- Sifres, A.; Blanca, J. y Nuez, F. 2010. Pattern of genetic variability of *Solanum habrochaetes* in its natural area of distribution. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 58:347-360
- Taylor, I. B. 1986. Biosystematics of the tomato. The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement. *Chapman and Hall*. pp. 1-34.
- Valarezo, O. E. 2002. Recomendaciones para el manejo de la negrita en el tomate en el Ecuador. Convenio INIAP-PROMSA-CEDEGE. Departamento Nacional de protección vegetal. Sección Entomología. Estación Experimental Portoviejo-Ec., 2002. Plegable divulgativo. 191.
- Velásquez V. R.; Medina A. M.; Schwartz, H. 2002. Expresión de síntomas y decoloración vascular en líneas de fréjol inoculadas con aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* de diferente origen geográfico. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 20: 1, p. 8-11.
- Zaykin, D. V., and A. I. Pudovkin. 1993. 2 Programs to Estimate Significance of Chi-2 Values Using Pseudo-Probability Tests. *J. Hered.* 84:152-152
- Zuriaga, E.; Blanca J.M.; Cordero, L.; Sifres, A.; Blas-Cerdán W.G.; Morales, R. y Nuez, F. 2009. Genetic and bioclimatic variation in *Solanum pimpinellifolium*. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 56:39-51.

# Detección del virus del amarillamiento de las nervaduras de la hoja de la papa en diferentes órganos de *Solanum tuberosum* grupo *Phureja* cv Criolla Colombia utilizando RT-PCR convencional y en tiempo real

## *Potato yellow vein virus* detection in different organs of *Solanum tuberosum* *Phureja* group cv Criolla Colombia by conventional and real time qRT-PCR

Hernández-Guzmán Anngie Katherine\*, Guzmán-Barney M. Mónica\*\*

### Resumen

La producción del cultivo de papa en Colombia se puede afectar por infección con diferentes patógenos virales, entre ellos, el *Potato yellow vein virus* (PYVV) que puede reducir la producción entre el 30 % y 50%. PYVV se ha diagnosticado molecularmente usando RT-PCR convencional en hojas sintomáticas y no sintomáticas. Sin embargo, no hay reportes sobre la detección y distribución viral en diferentes órganos infectados por PYVV en las plantas que expresan síntomas y sin síntomas. El objetivo de esta investigación, fue detectar a PYVV por RT-PCR convencional con cebadores específicos y por qRT-PCR (tiempo real) utilizando Sondas TaqMan® y analizar la distribución viral en plantas de *S. tuberosum* grupo *Phureja* cv. Criolla Colombia (papa criolla). Se logró la detección del virus en todos los órganos analizados (foliolo, peciolo, tallo aéreo y subterráneo, pedúnculo floral, pétalo y antera) mediante ambas técnicas, sin embargo, qRT-PCR fue 100 veces más sensible que la técnica convencional. Adicionalmente, se realizó la cuantificación absoluta del gen de la proteína mayor de la cápside de PYVV (CP). Los resultados indican que cuando la planta no expresa síntomas (NS), hay una distribución homogénea del virus, con un promedio del número de copias del gen CP de  $4.09 \times 10^7 \pm 2.35 \times 10^7$ ; mientras que en plantas sintomáticas el título viral es mayor ( $6.82 \times 10^8 \pm 1.74 \times 10^8$ ) y la distribución heterogénea en los órganos, con mayor acumulación en órganos de la zona aérea. Este es el primer informe sobre la detección de PYVV en diferentes órganos de papa por medio de tiempo real, incluyendo las anteras y pedúnculo floral. La información debe ser de utilidad para el diagnóstico de PYVV y para adelantar estudios sobre la biología del virus y la relación con el huésped y el vector. La información suministrada debe ser valiosa para agricultores y fitomejoradores, además para programas de indexado de plantas contra PYVV y en la certificación de semilla.

**Palabras clave:** Sondas TaqMan®, PYVV, Distribución, *Crinivirus*, Cuantificación absoluta.

### Abstract

Potato yield in Colombia could be affected by the infection with different viral pathogens, among which, *Potato vein yellow virus* (PYVV) could reduce potato production by 30% to 50%. PYVV has been diagnosed molecularly in symptomatic and symptomless leaves samples by conventional RT-PCR. However, the PYVV detection and distribution in different organs of symptomatic and symptomless plants have not been reported until now. The aim of this research was to detect and analyze PYVV distribution in different organs of infected *S. tuberosum* group *Phureja* cv. Criolla Colombia (papa criolla) plants by conventional and real time qRT-PCR using TaqMan® probes. It was achieved to detect the virus in all analyzed organs (leaflets, petiole, peduncle, anther, petals, aerial and underground stem) by both techniques; however, qRT-PCR was 100 times more sensitive than the conventional technique. Additionally, the absolute quantification of coat major protein gene (CP) was determined. The results shown that in symptomless plants (NS), PYVV was distributed homogeneously with an average CP gene copy number of  $4.09 \times 10^7 \pm 2.35 \times 10^7$ , while in symptomatic mild and severe plants (M) or (S) the viral load was greater ( $6.82 \times 10^8 \pm 1.74 \times 10^8$ ) with an heterogeneous distribution regarding the organ and with greater accumulation

\* Bióloga, MSc. Laboratorio de Virus Vegetales, Instituto de Biotecnología (IBUN), Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Colombia.

\*\* Bióloga, MSc., PhD. Laboratorio de Virus Vegetales, Instituto de Biotecnología (IBUN), Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Colombia. E-mail: mmguzmanb@unal.edu.co.

in the aerial organs. The results presented in this study will be important for PYVV detection and further studies on the virus biology, host and vector relations. The information should be useful to farmers, breeders, indexing and seed certification programs.

**Key words:** TaqMan® probes, PYVV, distribution, *Crinivirus*, absolute quantification.

**Recibido:** agosto 10 de 2013

**Aprobado:** mayo 2 de 2014

## Introducción

PYVV es un virus re-emergente con genoma tripartita ARNss+ con un tamaño de aproximadamente 17kb (Lievieratos *et al.*, 2004). Sus partículas virales son de morfología filamentosas que se limitan al floema (Salazar *et al.*, 2000). Pertenecen a la familia *Closteroviridae*, género *Crinivirus* (Martelli *et al.*, 2011). PYVV es el agente causal de la enfermedad del amarillamiento de las nervaduras de la papa (*Potato Yellow Vein Disease*, PYVD) (Salazar *et al.*, 2000) y se transmite por medio de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum*, Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae), de forma semipersistente, también presenta transmisión vegetativa por medio del tubérculo-semilla (Salazar *et al.*, 2000).

PYVD fue reportada por primera vez en Colombia por Alba (1950) en Antioquia. Actualmente, se ha dispersado a países vecinos como Venezuela, Ecuador y Perú debido al incremento de las poblaciones del vector y del transporte indiscriminado de germoplasma (Salazar *et al.*, 2000). PYVV afecta la producción de papa hasta un 50% en *Solanum tuberosum* grupo *Andigena* cv Diacol Capiro (Salazar *et al.*, 2000) y más de 25% en *S. tuberosum* grupo *Phureja* cv Criolla Colombia (papa criolla) (Guzmán *et al.*, 2012), razón por la que ha sido declarado como patógeno cuarentenario en Europa y Estados Unidos (European and Mediterranean Plant Protection Organization, 1979; United States Department of Agriculture – Animal and Plant Health Inspection Service, 2000).

La detección de PYVV se ha realizado en muestras de folíolo mediante NASH (Nucleic Acid Spot Hybridization) (Salazar *et al.*, 2000), RT-PCR (Offei *et al.*, 2004; Guzmán *et al.*, 2006- 2012; Guzmán y Rodríguez 2010; Wei *et al.*, 2009), y en brotes de tubérculo mediante RT-PCR y qRT-PCR (López *et al.*, 2006). A diferencia de otras técnicas, qRT-PCR tiene alta sensibilidad, especificidad, reproducibilidad, no requiere de un procesamiento post-PCR para la visualización de los resultados; adicionalmente, permite hacer una estimación precisa del número de copias de un gen viral presente en el tejido analizado. Es útil en diferentes estudios sobre biología de virus, asociación entre la intensidad de síntomas, acumulación viral, evaluación de resistencia, evaluación de la carga viral en la transmisibilidad del virus por el vector y eficiencia de replicación, entre otros. (Bustin, 2002; Heid *et al.*, 1996; Mackay *et al.*, 2002).

Hay poca información de la distribución de virus en plantas de papa infectadas, varios autores han demostrado que algunos virus se distribuyen en la planta de manera heterogénea (Leisner *et al.*, 1992; Singh y Singh, 1996 y 1998; Gosálves *et al.*, 2003; Fox *et al.*, 2005; Sánchez-Navarro *et al.*, 2007; Kogovšek *et al.*, 2011); Kogovšek *et al.* (2011) hacen uso de la técnica de qRT-PCR para analizar el título viral del *Potato virus Y* (PVY, *Potyvirus*) en diferentes órganos de plantas de *Solanum tuberosum* infectadas con el virus, reportando que el PVY presenta mayores títulos virales en tallos y folíolos sintomáticos, en folíolos no sintomáticos y tubérculos hay menores títulos virales, lo que demuestra que su distribución es heterogénea. Para PYVV se ha sugerido una distribución heterogénea del virus dentro del tubérculo (López *et al.*, 2006).

Los ensayos de detección de PYVV se han limitado a material foliar y a brotes de tubérculo, pero no se han analizado otros órganos. Teniendo en cuenta que PYVV se limita al floema de la planta, el objetivo del trabajo fue analizar la distribución y acumulación del virus mediante RT-PCR y qRT-PCR, en diferentes órganos de plantas de papa criolla sintomáticas y NS infectadas con el virus, por transmisión a través del vector natural. Los resultados aportan al conocimiento sobre la distribución y detección del PYVV en papa criolla y son útiles en programas de fitomejoramiento, procesos de indexación de plantas de papa, programas de cuarentena y de certificación de semillas de papa.

## Materiales y métodos

### Material vegetal y aislados virales

Se tomaron dos plantas de *S. tuberosum* grupo *Phureja* cv Criolla Colombia, provenientes del municipio de Chipaque (Cundinamarca) con una edad aproximada de dos meses que expresaban diferentes niveles de amarillamiento intervenal: una de sintomatología moderada (M) y otra de sintomatología severa (S). Estas fueron mantenidas en materia utilizando como sustrato una mezcla de tierra : cascarilla de arroz en relación (3:1). Estas plantas se denominaron plantas donadoras de PYVV.

Adicionalmente, se utilizaron plantas de *S. tuberosum* grupo *Phureja* Clon 1 obtenidas a partir de cultivo de meristemos *in vitro* adquiridas en el Laboratorio de cultivo de tejidos y de biología molecular de plantas del

IBUN. Estas plantas se denominaron plantas receptoras de PYVV.

### Transmisión de PYVV con vector natural *T. vaporariorum*

Los ensayos de transmisión se realizaron en el invernadero (no controlado) de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia en jaulas entomológicas selladas con malla anti-áfido (velo suizo que se utiliza de rutina como malla aislante de vectores). Las temperaturas ambientales fluctuaron entre 5 y 27°C.

Se estableció una cría de *T. vaporariorum* en plantas de calabacín (*Cucurbita pepo*). Aproximadamente 200 adultos avirulíferos de *T. vaporariorum* (confirmados previamente como negativos para PYVV por RT-PCR del gen CP) fueron liberados en una jaula entomológica que contenía dos plantas madres donadoras de PYVV (S ó M), confirmadas previamente por RT-PCR como positivas para el gen CP de PYVV. Aunque la mosca blanca transmite al virus de una manera semipersistente, es decir en pocos minutos u horas, en el presente estudio, las moscas blancas se mantuvieron en jaula entomológica durante un periodo de 48 horas para garantizar que se alimentaran del material infectado con PYVV y poder obtener individuos virulíferos (confirmados por RT-PCR).

Se liberaron 50 adultos virulíferos de *T. vaporariorum* en la jaula con un tamaño aproximado de 1m x 1m, donde se mantenían 12 plantas receptoras (confirmadas como negativas por RT-PCR para el gen CP de PYVV), y se dejaron por un periodo de 48 horas para garantizar el proceso de alimentación en la planta donadora y de la transmisión a las plantas receptoras.

Posteriormente, se utilizó el insecticida Karate® 1.5 cc/L para eliminar la mosca blanca de la jaula entomológica donde se mantenían las plantas receptoras. Estas se mantuvieron en jaulas entomológicas en el invernadero de la facultad de Agronomía UN, y se les realizó un seguimiento de expresión de síntomas, desde la aparición de amarillamiento de nervaduras secundarias en el ápice de las hojas. Además, se realizó un seguimiento a la infección del virus mediante la detección del gen CP de PYVV por RT-PCR.

Para evaluar la acumulación del virus en diferentes órganos se seleccionaron tres plantas receptoras cuando completaron 4 meses de edad, las cuales fueron positivas para CP-PYVV mediante RT-PCR, una planta no sintomática (NS), una con expresión moderada (M) de síntomas y una con expresión severa (S). Se realizó un muestreo aleatorio de diferentes órganos de cada planta tomando foliolo, pecíolo, tallo aéreo y subterráneo, raíz, pedúnculo floral, pétalo, antera (tabla 1).

### Detección de PYVV por RT-PCR convencional y en tiempo real

La extracción ARN se realizó de material foliar de las plantas donadoras y receptoras para confirmar la presencia/ausencia de PYVV por RT-PCR y de los diferentes órganos de las plantas infectadas descritas en la tabla 1, para lo cual se utilizó el reactivo Trizol® (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Todos los extractos fueron tratados con 20 U de DNasa I durante 15min a 37°C para descartar la contaminación con DNA.

El gen CP de PYVV se amplificó a partir de los extractos de ARN de los diferentes órganos de las plantas analizadas, utilizando RT-PCR convencional y en tiempo real con los iniciadores y sondas TaqMan® descritos en la tabla 2.

### Retrotranscripción

La síntesis de cDNA se llevó a cabo en un volumen final de 10µl adicionando una mezcla de 1X buffer de reacción (Epicentre), 1mM de dNTPs (Bioline), 10mM de DTT (Epicentre), 0.4µM de primer 3' (tabla 2), 1.6U de RNase inhibitor (Fermentas), 8U de MMLV HP (Epicentre) y 100ng de ARN. Se incubó durante una hora a 42°C seguida de una denaturación a 70°C por 10min. El cDNA se repartió en dos fracciones: una para RT-PCR convencional y otra para la reacción de qRT-PCR.

### PCR

Las reacciones de PCR contenían 1.6 µl de cDNA, 1X de buffer NH<sub>4</sub> (Bioline), 2.5mM de MgCl<sub>2</sub> (Bioline), 0.4 µM de dNTPs (Bioline), 0.4 µM de cada primer (F2/3') (tabla 2) y 1U de Biolasa (Bioline) en un volumen final de 10µl. La amplificación consistió de una denaturación inicial a 94°C durante 3min, seguido por 35 ciclos de denaturación a 94 °C durante 1 min, alineamiento a 55 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 1 min y una extensión final a 72 °C durante 10 min. Como control positivo se incluyó una muestra foliar de *S. tuberosum* grupo *Phureja* cv Criolla Colombia con síntomas de PYVD y como controles negativos una muestra foliar de una planta de Calamondino (*Citrofortunella madurensis*, Lour) infectada con el virus *Citrus tristeza virus* (CTV) de la familia *Closteroviridae*; y una muestra foliar de *S. tuberosum* grupo *Phureja* cv Criolla Colombia libre de virus (obtenida por cultivo *in vitro* de meristemos).

### PCR en tiempo real

Las reacciones de qRT-PCR se realizaron con el equipo LightCycler 480® (Roche), usando la química de sondas TaqMan® para la detección de un fragmento de 79 pb del gen CP de PYVV, como control interno de la reacción se amplificó un fragmento de 79 pb del gen



**Tabla 1.** Número de muestras analizadas para evaluar la acumulación del virus en diferentes órganos de plantas infectadas

Zona	Órgano	Plantas por expresión de síntoma		
		NS	M	S
Radical	Tallo subterráneo	2	6	9
Radical	Raíz	7	4	18
Aérea	Foliolo	24	27	36
Aérea	Pecíolo	24	27	39
Aérea	Tallo aéreo	3	7	10
Aérea	Pétalo	0	6	2
Aérea	Pedúnculo floral	0	6	2
Aérea	Antera	0	6	2

Citocromo oxidasa (COX, gen de expresión constitutiva en la planta). Se utilizaron las sondas e iniciadores reportados por López *et al.*, (2006) con algunas modificaciones en el marcaje de las sondas (tabla 2).

Para la reacción se utilizó 1X de buffer NH<sub>4</sub> (Bioline), 5.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Bioline), 0.5 mM de dNTPs (Bioline), 0.3 µM de cada primer, 0.24 µM de la sonda (tabla 2), 1U de Biolasa (Bioline), 2 µl de cDNA en un volumen final de 10µl. Los ciclos de amplificación consistieron de una denaturación durante 10 min a 95 °C, 45 ciclos de amplificación con una denaturación a 95 °C por 10 s y alineamiento a 55 °C por 30 s (siguiendo los protocolos estándar del laboratorio de virus vegeta-

les IBUN). En las reacciones se incluyeron los controles descrito en la tabla 3.

Adicionalmente cada una de las muestras fue amplificada con una pareja de iniciadores para el gen COX con el objetivo de confirmar que las extracciones de ARN fueron realizadas apropiadamente y poder descartar falsos negativos en las amplificaciones del gen CP de PYVV.

#### ***Construcción de la curva estándar para la cuantificación absoluta***

Para determinar el número de copias del gen CP de PYVV, se construyó una curva estándar utilizando dilu-

**Tabla 2.** Secuencias de los iniciadores y sondas utilizados en las reacciones de RT-PCR convencional y en tiempo real.

Reacción	Gen	Primer/ Sonda	Dirección	Secuencia	Tamaño esperado	Referencia
RT-PCR	CP-PYVV	F2	Hacia adelante	5'-CTC GAG GAT CCT CAT GGA AAT CCG AT-3'	759pb	Rodríguez <i>et al.</i> , 2009
		3'	Hacia atrás	5'-AAG CTT CTA CTC AAT AGA TCC TGC TA-3'		
qRT-PCR	CP-PYVV	591F	Hacia adelante	5'-CGG AGA TTA TGT CAA TGG TTC GA-3'	79pb	López <i>et al.</i> , 2006
		670R	Hacia atrás	5'-TTG CTG CAT TCT TGA ACA GGT AA-3'		
		Sonda CP *(465:510)		5'-6-FAM AAC CAA CAT TTC TGA TGA TGA TTT GAC TGC AA-3' BHQ1		
	+ Cox- Planta	COX-F	Hacia adelante	5'-CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA-3'	79pb	
		COX-R	Hacia atrás	5'-CAA CTA CGG ATA TAT AAG AGC CAA AAC TG-3'		
		Sonda COX *(533:580)		5'-HEX TGC TTA CGC TGG ATG GAA TGC CCT 3' BHQ2		

\* Los valores entre paréntesis corresponden a las longitudes de onda en nanómetros de excitación : emisión de los fluorocromos. En el trabajo de López *et al.* (2006) la sonda para detectar a COX estaba marcada con JOE, en este caso el marcaje se hizo con HEX

+ Control interno de reacción

ciones seriadas de transcritos del gen CP de concentración conocida.

Para la obtención de los transcritos se utilizó un plásmido pGEM-T® (Promega) en el que el inserto era el gen completo de la proteína mayor de la cápside (donado por la estudiante de doctorado en Biotecnología UN, Patricia Rodríguez del laboratorio de Virus Vegetales del IBUN). El plásmido se linealizó con la enzima de restricción *Pst*I (Promega) cuyo sitio de reconocimiento permite que el promotor T7 de la RNA polimerasa quede corriente arriba del inserto; la restricción se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, el plásmido linealizado fue purificado utilizando el kit Wizard® DNA Clean-Up System (Promega). Finalmente, se realizó la transcripción *in vitro* teniendo en cuenta la siguiente mezcla de reacción: 1 µg de DNA, 0.5 mM rNTPs (Invitrogen), 5X de buffer de reacción (Invitrogen), 50 U de RNase inhibitor (Invitrogen), 10 mM de DTT (Invitrogen) y 30 U de RNA polimerasa T7 (Invitrogen) en un volumen final de 50 µl, el cual fue incubado durante 1 h a 37 °C, según indicaciones de la casa comercial.

Se realizaron diluciones seriadas del transcrito obtenido, las cuales servirían como patrones en la construcción de la curva estándar después de la determinación de su concentración utilizando el kit Quant-iT™ RiboGreen® RNA Assay (casa comercial Invitrogen).

La curva estándar se obtuvo graficando el valor Ct (en inglés *threshold cycle*) de cada una de las diluciones versus el logaritmo del número de copias del gen CP de PYVV. Cada punto de la curva estándar se corrió por duplicado. Para validar la cuantificación absoluta se corrió en tres ensayos independientes. La estimación del número de copias del gen CP de los estándares utilizados para la construcción de la curva estándar se hizo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Número de copias gen CP} = \frac{(\text{cantidad de transcrito} \times (\text{número de avogadro}))}{\# \text{ pares de bases} \times (1 \times 10^3) \times 340}$$

En donde la cantidad de transcrito de ARN se expresa en mg, el número de avogadro corresponde a  $6.02 \times 10^{23}$ , pb a número de pares de bases del transcrito, es un factor de conversión para convertir de g a mg, 340 es el peso molecular promedio de un nucleótido en una hebra sencilla de ARN. Se determinó el título viral en cada una de las muestras de las plantas por la interpolación del valor Ct en la curva de calibración normalizada.

### Análisis estadísticos

Se calculó el promedio del número de copias para cada órgano evaluado, la desviación estándar y coeficiente de variación (CV%) inter-ensayo (porcentaje de la desviación estándar en comparación con el promedio del número de copias) utilizando el programa R (R Development Core Team, 2008). La distribución de todos los datos fue evaluada utilizando el test de normalidad Shapiro Wilk. Debido a que los resultados no presentaron una distribución normal se realizaron comparaciones para evaluar si se presentaban diferencias en la carga viral entre los órganos mediante la aplicación de una prueba Mann-Whitney acompañada de la corrección de Bonferroni a nivel de significancia ( $p < 0.05$ ) para controlar la tasa de error (Yuan *et al.*, 2006).

### Resultados

#### Transmisión de PYVV utilizando el vector natural

Solamente después de 21 días post-transmisión (dpt), PYVV se detectó en las plantas receptoras a través de amplificación del gen CP de PYVV por RT-PCR convencional (figura 1). Los ensayos de detección por RT-PCR incluyen plantas receptoras que no expresa

**Tabla 3.** Controles incluidos en las reacciones de qRT-PCR

Tipo de control	Molde	Observación
Positivo	<i>S. tuberosum</i> Grupo <i>Phureja</i> cv. Criolla Colombia infectada con PYVV RT-PCR positivo para el gen CP de PYVV	
	Uno de los transcritos utilizados para la construcción de la curva estándar.	Evaluación de reproducibilidad
Negativo	Sin molde.	Evaluación de contaminación de reactivos
	<i>C. madurensis</i> infectada con CTV	Evaluación de reacciones cruzadas con otros virus de la familia <i>Closteroviridae</i>
	<i>S. tuberosum</i> grupo <i>Phureja</i> Clon 1 obtenida a partir de cultivo de meristemos <i>in vitro</i>	Evaluación de reacciones cruzadas con genes de la planta
	*RT-	Evaluación de contaminación con DNA en los extractos de RNA

\* Reacción en la que se utiliza como molde RNA proveniente de una planta que expresa síntomas para la enfermedad causada por PYVV, en la que no se hace retrotranscripción.

ron síntomas (NS), transmitidas a partir de plantas donadoras M (Carriles 2 al 6); plantas que expresaron síntomas, transmitidas a partir de plantas donadoras S (Carriles 7 al 13).

A pesar de la detección del virus en algunas de las muestras a los 21 dpt, la expresión de síntomas se observó en algunos folíolos a partir de los 28 a 32 dpt. y a nivel sistémico entre los 42 a 45 dpt (figura 2).

De las doce plantas utilizadas como receptoras, solamente se observó la expresión de amarillamiento intervenal en el 58.3% de las plantas (7/12), en las cuales se detectó el virus mediante RT-PCR. PYVV también fue detectado en dos plantas que no expresaron síntoma de amarillamiento intervenal, lo que indica que el porcentaje de transmisión de PYVV fue del (75%) (9/12). Sin embargo, otros autores como (Gamarra, 2002) informa que la eficiencia de trasmisión de PYVV es baja de 6% utilizando *Solanum tuberosum* Grupo Andígena (variedad Diacol-Capiro). En el presente estudio, el porcentaje de transmisión y la expresión de síntomas en las plantas receptoras después de la transmisión, dependió de la planta donadora de PYVV y de su título viral, es decir, que cuando se utilizó planta donadora S el porcentaje de transmisión fue del 100% (7/7) y todas las plantas receptoras expresaron síntoma de amarillamiento intervenal. Sin embargo, con la planta donadora M el porcentaje de transmisión sólo fue del 40% (2/5) y ninguna de las plantas expresó síntomas (tabla 4).

#### **Detección del gen CP de PYVV por RT-PCR en diferentes órganos de plantas con diferente nivel de expresión de síntomas**

A partir del ensayo de transmisión se seleccionaron tres plantas receptoras en las que se había detectado el virus por RT-PCR: una S, una M y una NS; las cuales fueron evaluadas mediante RT-PCR para analizar la distribución del virus en los diferentes órganos (tabla 1).

El virus se detectó en todos los órganos evaluados de las tres plantas (figura 3). En la planta S se detectó el virus en el 92.3% (109/118) de las muestras analizadas, en la planta M en el 95.5% (85/89), y en la planta NS sólo se detectó el PYVV en el 46.6% de las muestras (32/60).

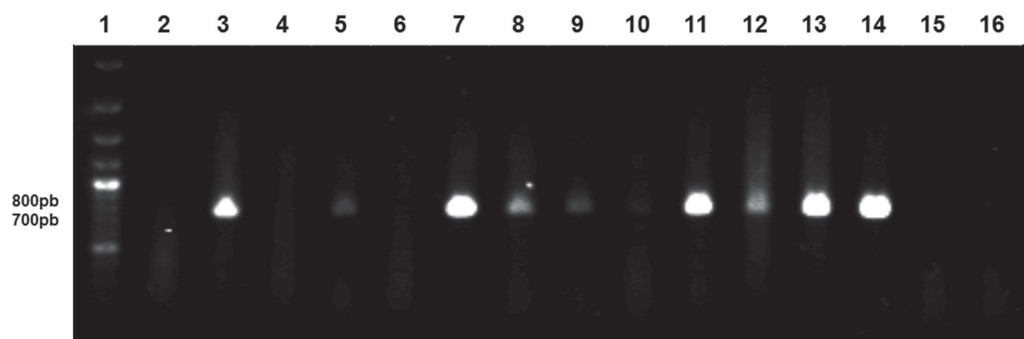
#### **qRT-PCR para la detección de PYVV en diferentes órganos de plantas con diferente nivel de expresión de síntomas**

En todas las muestras evaluadas se amplificó el control interno (COX), los valores Ct fueron similares con un promedio de  $15.9 \pm 0.46$  (figura 4A). El coeficiente de variación inter-ensayo no fue mayor al 7% indicando una buena reproducibilidad.

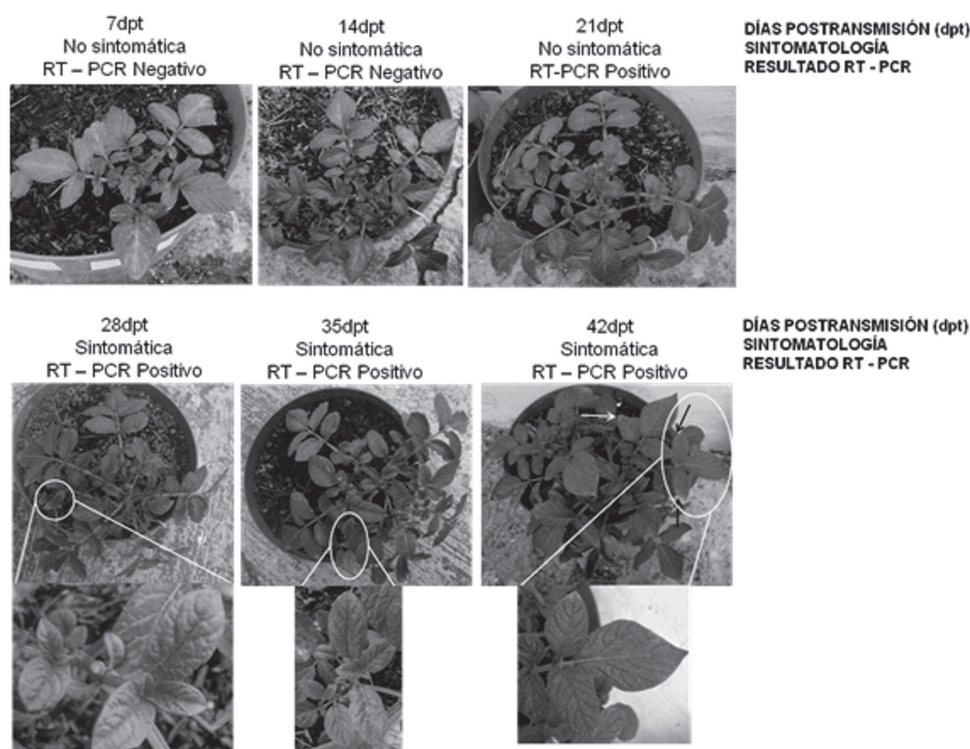
Aunque por RT-PCR convencional el virus se logró detectar en todos los órganos analizados de las tres plantas evaluadas, la detección no se dio en la totalidad de las muestras, lo que si se consiguió en la técnica de qRT-PCR, la cual permitió la detección del virus incluso en las muestras que habían resultado negativas por RT-PCR convencional (41/267), en donde el porcentaje de falsos negativos fue del 15.4%.

Para poder hacer la cuantificación absoluta del gen CP de PYVV se construyó una curva estándar con diluciones de transcritos de concentración conocida que iban desde  $10^6$  hasta  $10^{10}$  (figura 5).

El valor Ct para el gen CP estuvo entre 14.57 y 24.47 (valor promedio de  $18.89 \pm 2.22$ ) (figura 4B), con un número de copias del gen CP entre  $9.17 \times 10^6$  y  $4.86 \times 10^9$  (valor promedio de  $5.22 \times 10^8 \pm 7.05 \times 10^7$ ). La gran mayoría de falsos negativos obtenidos en la técnica convencional provenían de plantas NS, las cuales presentaron un promedio del número de copias del gen CP de  $4 \times 10^7$ , el cual fue significativamente menor (Prueba Mann Whitney,  $p < 0.05$ ) en casi un grado de



**Figura 1.** RT-PCR del gen CP de PYVV en muestras foliares de plantas receptoras después de 21 dpt. El primer carril corresponde a marcador de peso molecular GeneRuler™ 100pb (Fermentas). Carriles 2-6: plantas que no expresaron síntomas (NS), transmitidas a partir de plantas donadoras M. Carriles 7-13: plantas que expresaron síntomas, transmitidas a partir de plantas donadoras S, Carril 14: control positivo (muestra de planta que expresaba síntomas para PYVV positiva por RT-PCR). Carril 15: control negativo con muestra de calamondino infectada con CTV. Carril 16: control negativo con muestras de planta *in vitro* de *S. tuberosum* grupo *Phureja* libre de virus.



**Figura 2.** Seguimiento semanal de la expresión de síntomas de amarillamiento intervenal en plantas receptoras, por infección con PVYV transmitido a través de vector natural *T. vaporariorum*. En el panel superior se encuentran las observaciones realizadas a 7, 14 y 21 dpt, en donde no se evidenció la expresión de síntomas; en el panel inferior se encuentran las observaciones realizadas a los 28, 35 y 42 dpt en donde se empezó a evidenciar la expresión de amarillamiento intervenal, el cual fue local entre los 28 y 35 días, y entre los 42 y 45 días fue evidente la expresión de este síntoma a nivel sistémico. Los círculos blancos enmarcan las hojas que expresan amarillamiento intervenal.

magnitud, que las muestras provenientes de plantas sintomáticas (figura 6, Prueba Mann Whitney,  $p < 0.05$ ). El número de copias del gen CP en plantas con síntomas de amarillamiento intervenal (figura 6) no se vio afectado por la intensidad del síntoma, la diferencia del título viral entre la planta con síntoma severo y la planta con síntoma moderado no fue estadísticamente significativa (Prueba Mann Whitney,  $p = 0.184$ ).

#### ***Acumulación de PVYV en diferentes órganos de plantas infectadas***

Los resultados de la figura 7 y de la tabla 5 indican que el título viral acumulado en los diferentes órganos de la planta NS, no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Prueba de Mann Whitney,  $p = 0.136$ ), lo que sugiere que la distribución del virus en esta planta es homogénea, además, cada órgano de esta planta presenta un título viral significativamente menor que el acumulado en plantas sintomáticas (Prueba Mann Whitney,  $p < 0.05$ ).

Al comparar el título viral acumulado en diferentes órganos de plantas sintomáticas (figura 7 y tabla 5) se encontró diferencias estadísticamente significativas entre órganos de la zona radical y los de la zona aérea

(Prueba Mann Whitney,  $p > 0.05$ ), sugiriendo una acumulación heterogénea, con mayor acumulación en órganos de la zona aérea.

#### **Discusión**

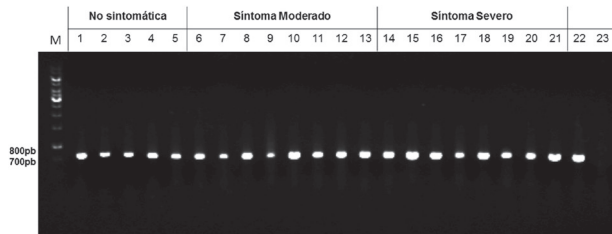
El objetivo de este trabajo era evaluar la distribución de PVYV en diferentes órganos de plantas infectadas, para lo cual era necesario contar con plantas que solo estuvieran infectadas por este patógeno, debido a que infecciones mixtas pueden afectar algunos aspectos como la expresión de síntomas (reducción o exacerbación), rango de hospederos (García-Cano *et al.*, 2006), y diferencias de tropismo y del título viral acumulado en diferentes órganos (Wege y Siegmund, 2007); estudios serológicos realizados en muestras de accesiones de bancos de germoplasma del grupo *Phureja*, han demostrado que algunas plantas mantenidas en campo pueden estar infectadas con uno o varios virus dentro de los que se reportaron: *Potato virus S* (PVS, *Flexiviridae*), *Potato Leafroll virus* (PLRV, *Luteoviridae*), *Potato virus Y* (PVY) y *Potato virus X* (PVX, *Flexiviridae*) (Guzmán *et al.*, 2010); a través de estudios de secuenciación profunda, Silvestre *et al.*, (2012) encontraron que PVYV puede estar en coinfección con PVY; para



**Tabla 4.** Resultados de RT-PCR y sintomatología de las plantas receptoras después de la transmisión.

Sintomatología plantas donadoras	% de plantas receptoras RT-PCR (+)	Sintomatología plantas receptoras RT-PCR (+)	Nivel de intensidad de síntomas	Número de plantas
Moderada	40% (2/5)	No sintomáticas	NS	2
Severa	100% (7/7)	Sintomáticas	M	4
			S	3

Los valores entre paréntesis equivale a la relación de plantas que fueron RT-PCR (+) sobre plantas totales.



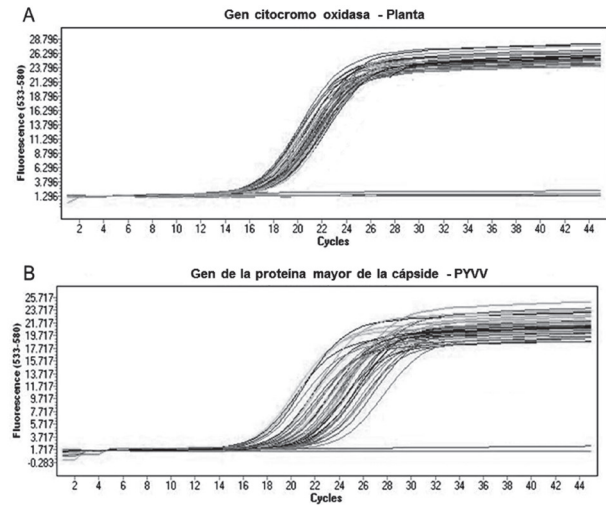
**Figura 3.** RT-PCR de muestras de diferentes órganos de plantas con diferentes niveles de expresión de síntomas (NS, M, S). El primer carril corresponde al marcador de peso molecular GeneRuler™ 1Kb (Fermentas). Los carriles 2, 7 y 13 son muestras de tallo aéreo, los carriles 3, 8 y 16 corresponden a peciolo, los carriles 4, 9 y 17 corresponden a foliolo, los carriles 5, 10 y 18 corresponden a tallo subterráneo, los carriles 6, 11 y 19 corresponden a raíz, los carriles 12 y 20 corresponden a pedúnculo floral, los carriles 13 y 21 corresponden a antera, los carriles 14 y 22 corresponden a pétalo, el carril 23 es el control positivo y el carril 24 es el control negativo.

garantizar que las plantas analizadas solo estuvieran infectadas con PVV, se realizó transmisión a plantas libres de virus utilizando el vector natural que es *T. vaporariorum*, el cual no podría transmitir PVV porque su vector es *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphidae). (Van Hoof, 1980).

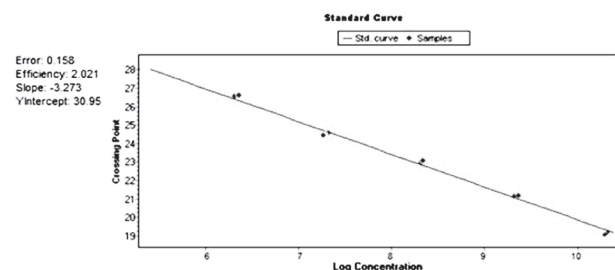
La eficiencia de transmisión (porcentaje de plantas infectadas por el virus durante la transmisión) obtenida en este ensayo fue del 75% (9/12 plantas), aunque no fue del 100%, es posible que en condiciones naturales y climáticas adecuadas la transmisión de PVV por vector pueda ser más alta. La metodología utilizada en este trabajo permitió la obtención de una eficiencia alta comparada con la obtenida por otros autores, que realizaron ensayos de transmisión de PVV, Gamarra (2002) reportó un 6%, mientras que Arciniegas et al. (2008) reporta un porcentaje de transmisión del 12%.

Con respecto a la expresión de síntomas, los resultados fueron similares a los obtenidos por Arciniegas et al. (2008) en donde la expresión se dio entre los 28 y 32 días. En este trabajo se encontró que cuando la planta donadora era M, no se observó síntomas en las plantas receptoras (a pesar de esto se confirmó la

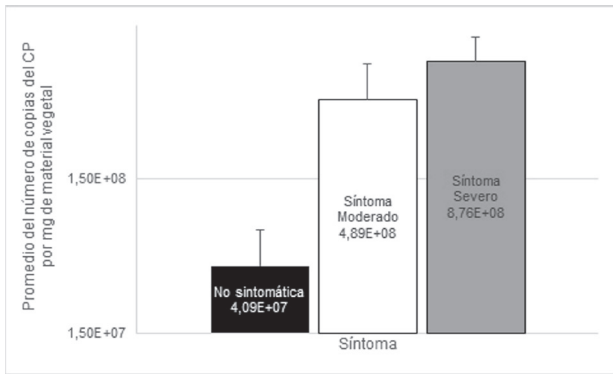
presencia del virus mediante RT-PCR en algunas plantas que no expresaron síntomas), contrario a lo que sí ocurrió cuando la planta donadora era S. Esto podría indicar que el título viral de la fuente de inóculo está relacionado con la expresión de síntomas en la planta receptora, por lo tanto las plantas donadoras M tendrían un menor título viral que las plantas S, lo que influye sobre todo cuando la transmisión no es persis-



**Figura 4.** Curvas de amplificación. En el panel A se observan las curvas de amplificación para el gen COX de la planta. En el panel B se observan las curvas de amplificación para el gen CP de PVV para un grupo de muestras sintomáticas y no sintomáticas. En ambas figuras las curvas planas corresponden a los controles negativos.



**Figura 5.** Curva estándar construida para la cuantificación absoluta del gen CP de PVV.



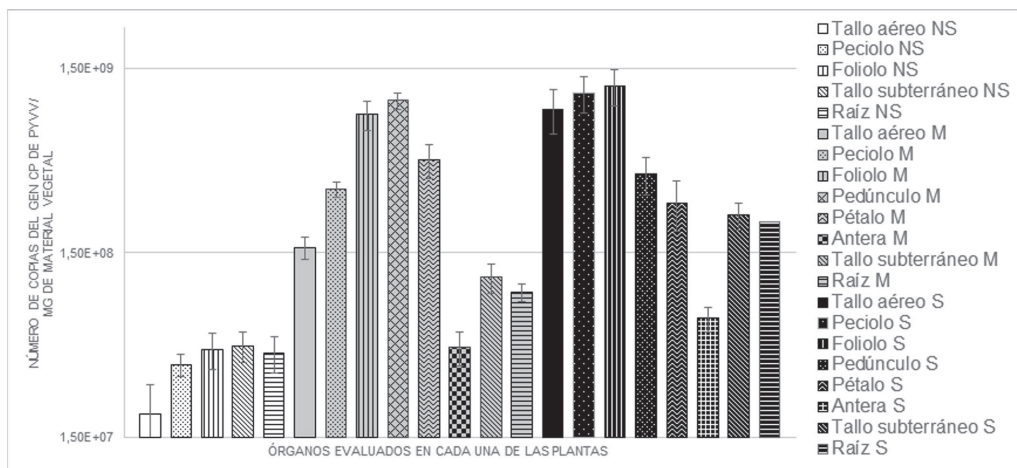
**Figura 6.** Determinación del número de copias del gen CP en plantas con diferente nivel de sintomatología (NS, M, S). Los valores dentro de las barras corresponden al valor promedio del número de copias del gen CP de PYVV. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

tente o es semipersistente como en PYVV (Salazar *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 1990; Tamayo y Navarro 1984) debido a que no hay replicación del virus dentro del insecto y por lo tanto, durante el periodo de adquisición, el título viral alcanzado por el insecto vector debería ser proporcional al título viral de la planta fuente de inoculo.

En los ensayos de detección del virus en los diferentes órganos de plantas receptoras se encontró que la técnica de RT-PCR en tiempo real, siendo más sensible permitió la detección de PYVV en muestras que habían sido negativas (falsos negativos) por la técnica RT-PCR convencional, las muestras que fueron falsos negativos por la técnica convencional presentaron un título viral menor ( $4 \times 10^7$ ) que las que lograron ser detectadas mediante esta técnica ( $6 \times 10^8$ ), lo que expone una de las restricciones de la técnica convencional la cual depende de un límite en el número de copias para lograr un resultado positivo, conllevando a falsos negativos, que en este caso fue del 15,8%.

**Tabla 5.** Contraste órgano específico en el número de copias del gen CP de PYVV acumulado en plantas sintomáticas. El signo “+” indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), y “-” lo contrario ( $p > 0.05$ ). El órgano, la intensidad de expresión de síntomas y la combinación de estos dos factores afectan la acumulación del virus. (Prueba de Friedman,  $p < 0.05$ )

Órgano	Antera	Foliolo	Peciolo	Pedúnculo floral	Pétalo	Tallo Subterráneo	Raíz
Foliolo	+						
Peciolo	+	-					
Pedúnculo floral	+	-	-				
Pétalo	+	-	-	-			
Tallo Subterráneo	-	+	+	+	-		
Raíz	-	+	+	+	+	-	
Tallo	+	+	-	+	-	+	+



**Figura 7.** Promedio del número de copias del gen CP de PYVV en diferentes órganos de papa criolla en plantas con diferente nivel de expresión de síntomas utilizando qRT-PCR. En la planta NS no se evaluó muestras de pedúnculo, pétalo y antera debido a que no se desarrollaron flores.

Los resultados de la técnica de RT-PCR en tiempo real indicaron que en la planta NS, la distribución del virus en los órganos analizados fue homogénea, este patrón de distribución con un bajo título viral podrían estar relacionados con la ausencia de expresión de síntomas en estas plantas, hay que tener en cuenta que estos ensayos fueron realizados en condiciones de laboratorio, pero en condiciones naturales, las plantas NS podrían ser el resultados de eventos de transmisión en donde el inóculo presenta bajo título viral (menor de  $4 \times 10^7$ ), o plantas que presentan infecciones tardías que hasta ahora están comenzando el desarrollo de la enfermedad.

Por otro lado, las plantas que expresaron síntomas presentaron una distribución diferencial del virus (distribución heterogénea), aspecto reportado por otros autores; Singh y Singh (1996 y 1998) detectaron el virus *Potato virus A* (PVA, *Potyvirus*) en tubérculos y otros tejidos de plantas de papa con una distribución heterogénea; de la misma manera, Kogovšek et al. (2011) reportaron la detección de PVY en diferentes órganos de plantas infectadas, el cual presentó una distribución heterogénea con mayor acumulación en los folíolos; para nuestro caso la mayor concentración se presentó en la zona aérea; esto podría ser una estrategia de dispersión, porque al mantenerlo en esta zona, el virus quedaría más accesible a la mosca blanca, contribuyendo de esta manera con la dispersión del mismo, este aspecto no había sido estudiado previamente en PYVV, pero si en otros virus como por ejemplo *Carnation etched ring virus* (CERV, *Caulimoviridae*) y *Carnation vein mottle virus* (CVMV, *Potyvirus*), que son transmitidos por miembros de la familia *Aphididae*, estos presentaron una menor acumulación viral en la zona radical (Sánchez-Navarro et al., 2007), en casos de virus que son transmitidos por hongos que habitan en el suelo o nematodos, se ha descrito que estos se concentran principalmente en la zona radical, como es el caso de los *Carmovirus* que son transmitidos por hongos del suelo (Gosalvez et al., 2003) y *Tobravirus* que son transmitidos por nematodos (Schmitt et al., 1998; MacFarlane y Popovich, 2000).

El folíolo fue uno de los órganos que presentó mayor carga viral en plantas sintomáticas, y este es el órgano del que prefiere alimentarse la mosca blanca, sumado a esto PYVV es un patógeno limitado al floema y la mosca blanca se alimenta del floema (Cohen et al., 1996), estos aspectos podrían resultar en un mayor éxito de transmisión. Los hábitos alimenticios de la mosca blanca reforzarían la idea de que el virus se acumula en las plantas de manera que sea muy accesible al vector, apoyando el concepto de un proceso de coevolución entre el vector y el virus (Lovisolo et al., 2003).

Hay que tener en cuenta que este virus también puede ser transmitido vegetativamente a través de tubérculo-semilla, aspecto que no se evaluó en este trabajo

porque ya se había abordado previamente; Guzmán-Barney et al. (2012) en un trabajo realizado en material colectado en un cultivo del municipio de Mosquera (Cundinamarca), reportaron que el virus se acumula en los tubérculos de manera heterogénea en la zona radical, tanto en plantas sintomáticas como NS como en plantas sintomáticas, los títulos virales reportados en ese trabajo se encontraron entre  $3.42 \times 10^2$  a  $6.01 \times 10^8$ , lo que podría explicar la falta de expresión de síntomas en algunos individuos de la progenie obtenidos a partir de plantas sintomáticas.

Sería interesante hacer ensayos de detección del virus en semilla sexual, lo que permitiría dilucidar algunos aspectos de transmisión de este virus (transmisión sexual), porque hasta el momento no se ha demostrado si PYVV puede ser transmitido de esta manera, aunque la probabilidad de que PYVV presente este tipo de transmisión es baja, no se puede descartar que algunos eventos de dispersión sean llevados a cabo a través de este mecanismo. No hay muchos reportes sobre la detección de virus fitopatógenos en semilla sexual, Maruthi et al. (2005) reportaron que no se logró detectar *Cassava brown streak virus* (CBSV, *Ipomovirus*) en muestras de semilla aunque el virus fue detectado en muestras de flores y frutos, según estos autores posiblemente existe un mecanismo que excluye el virus del embrión y por esta razón este virus no es transmisible sexualmente, en este trabajo el virus se logró detectar en el órgano reproductor masculino (antera), es posible que PYVV tenga un mecanismo similar al de CBSV pero esto estaría por confirmarse.

La detección de plantas infectadas por virus y su eliminación es un paso importante en los programas de manejo y control para poder evitar su dispersión, por lo tanto, la incorporación de técnicas de detección con un alto grado de sensibilidad que permitan la detección del virus tanto en plantas sintomáticas como en no sintomáticas, es de vital importancia en procesos de diagnóstico para la detección de plantas infectadas. Este resultado es útil para el mantenimiento y sanidad de los bancos de germoplasmas, en procesos de fitomejoramiento, indexado de plantas contra PYVV, programas de cuarentena y en certificación de semilla. Además, esta técnica no solamente es útil en procesos de diagnóstico, también ha sido de gran utilidad en estudios de expresión de genes y en estudios que evalúan diversos aspectos de la biología de virus, en este caso se utilizó para evaluar la distribución del virus en plantas infectadas lo que además de aportar información del virus, es una base para la selección de órganos en los procesos de detección.

## Conclusiones

Es de resaltar que este es el primer trabajo sobre la detección y distribución de PYVV utilizando tiempo real, en diferentes órganos de plantas de papa criolla que

expresaban síntomas de amarillamiento de venas y sin la expresión de los síntomas (no sintomáticas) pero infectadas por el virus. La información generada puede ser de gran importancia para dilucidar algunos aspectos relacionados con la transmisión del virus a partir de semilla-tubérculo como por transmisión por vector y aún con la posibilidad de transmisión sexual pues se detectó en anteras. Faltan trabajos complementarios y más amplios sobre estos aspectos de la biología y distribución viral en la planta. También, los resultados de este trabajo pueden ser útiles en programas de fitomejoramiento, de indexado de plantas de papa contra PVV, programas de cuarentena y de certificación de semillas de papa libres de virus.

Por primera vez se detecta al virus PVV en diferentes órganos como peciolo, pedúnculo floral, antera, pétalo y raíz; de plantas de *S. tuberosum* Grupo *Phureja* (variedad Criolla Colombia) utilizando las técnicas moleculares de RT-PCR convencional y q-RT-PCR, siendo esta última la más sensible debido pues permitió la detección en muestras de plantas que habían dado resultado negativo por la técnica convencional de RT-PCR. Adicionalmente, es la primera vez que se analiza la distribución del virus PVV como homogénea o heterogénea en los órganos analizados y en las plantas sintomáticas y no sintomáticas. Las plantas no sintomáticas presentaron títulos virales menores y en distribución más homogénea dentro del órgano que las plantas que expresaban síntomas. Por lo tanto se pueden realizar otros estudios que aporten a la comprensión de la biología de PVV dentro de la planta, puesto que anteriormente solo se había reportado el uso de RT-PCR con fines del diagnóstico viral. La técnica de qRT-PCR permitió la detección viral en un mayor porcentaje de muestras (mayor al 90%) y una mayor sensibilidad para la detección viral en todos los órganos evaluados comparado con la técnica de RT-PCR convencional (15.8% de falsos negativos).

## Agradecimientos

Esta investigación se realizó gracias al apoyo económico y técnico del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia y a Colciencias (201010016538). Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. A Carlos Barragán por el apoyo en los ensayos de transmisión, a Patricia Rodríguez por su apoyo en la construcción de la curva estándar y a Ángela Villamil, por los valiosos aportes realizados.

## Referencias bibliográficas

Alba, V. 1950. Viropatógenos. Memorias de la Conferencia Latinoamericana de Especialistas en Papa (Bogotá, Colombia). pp. 52-58.

Arciniegas, N., Guzmán, M. y Núñez, C. 2008. Metodología de evaluación de resistencia al virus del amarillamiento de las venas de la papa (PVV) en genotipos de la colección central co-

lombiana de *Solanum Phureja*. Memorias XXIV Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología ASCOLFI.

Bustin, S. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT - PCR): Trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*. 29: 23-39.

Cohen, A., Henneberry, T. and Chu, C. 1996. Microstructure of feeding in nymphal *Bemisia argentifolii* in cotton and cantaloupe. *Entomologia Experimentalis Applicata*. 78: 135-142.

Díaz M., Pulgarín J. y Saldarriaga A. 1990. Relaciones insecto-patógeno en el problema del amarillamiento de las venas de la papa. *Revista Colombiana de Entomología*. 16: 3-14.

European and Mediterranean Plant Protection Organization. 1979. Data sheets on quarantine organisms No. 29, Potato vein yellowing virus. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 9 (2). [[http://www.eppo.org/QUARANTINE/virus/Potato\\_yellow\\_vein\\_virus/PYVV00\\_ds.pdf](http://www.eppo.org/QUARANTINE/virus/Potato_yellow_vein_virus/PYVV00_ds.pdf)].

Fox, A., Evans, F. and Browning, I. 2005. Direct tuber testing for Potato Y potyvirus by real-time RT-PCR and ELISA: reliable options for post-harvest testing?. *EPPO Bulletin*. 35: 93-97.

Gamarra, H. 2002. Transmisión del virus del amarillamiento de las venas de la papa en variedades y/o clones de *Solanum tuberosum* Linneo, 1753. Universidad Ricardo Palma. Facultad de Ciencias Biológicas. Lima, Perú.

García-Cano, E., Resende, R., Fernández-Muñoz, R. and Moriones, E. 2006. Synergistic interaction between *Tomato chlorosis virus* and *Tomato spotted wilt virus* results in breakdown of resistance in tomato. *Phytopathology*. 96: 1263-1269.

Gosalvez, B., Navarro, J., Lorca, A., Botella, F., Sánchez-Pina, M. and Pallas, V., 2003. Detection of *Melon necrotic spot virus* in water samples and melon plants by molecular methods. *Journal of Virological Methods*. 113: 87-93.

Guzmán, M., Ruiz, E., Arciniegas, N. and Coutts, R. 2006. Occurrence and variability of *Potato yellow vein virus* in three departments of Colombia. *Phytopathology*. 154: 748-750.

Guzmán, M. y Rodríguez, P. 2010. Susceptibilidad de *Solanum phureja* (Juz. et Buk.) al virus del amarillamiento de las venas. *Agronomía Colombiana*. 28: 219-224.

Guzmán, M., Román, V., Franco, L. y Rodríguez, P. 2010. Evaluación serológica de cuatro virus en accesiones colombianas de papa (*Solanum* spp.). *Agronomía Colombiana*. 28(2): 225-234.

Guzmán, Barney, M., Franco-Lara, L., Rodríguez, D., Vargas, L., Fierro, J. 2012. Yield losses in *Solanum tuberosum* group *Phureja* cultivar Criolla Colombia in plants with symptoms of PVV in field trials. *American Journal of Potato Research*. 89: 438-447.

Guzmán, Barney, M., Hernández, A. and Franco-Lara, L. 2012. Tracking foliar symptoms caused by tuber-borne *Potato yellow vein virus* (PVV) in *Solanum Phureja* (Juz et Buk) Cultivar "Criolla Colombia". *American Journal of Potato Research*. 90(3): 284-293.

Heid, C., Stevens, J., Livak, K. and Williams, M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Methods*. 6: 986-994.

Kogovšek, P., Kladnik, A., Mlakar, J., Tušek Žnidarič, M., Dermastia, M., Ravnikar, M. and Pompe-Novak, M. 2011. Distribution of *Potato virus Y* in potato plants, organs, tissues, and cells. *Phytopathology*. 101(11): 1292-1300.

Leisner, S., Turgeon, R. and Howell, S. 1992. Long Distance Movement of *Cauliflower Mosaic Virus* in Infected Turnip Plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 5: 41-47.

Livieratos, I., Eliasco, E., Müller, G., Olsthoorn, R., Salazar, L., Pleij, C. and Coutts, R. 2004. Analysis of the RNA of *Potato yellow vein virus*: Evidence for a tripartite genome and conserved 3'-terminal structures among members of the genus *Crinivirus*. *Journal of General Virology*. 85: 2065-2075.

López, R., Asencio, C., Guzmán, M. and Boonham, N. 2006. Development of real-time and conventional RT-PCR assays for the detection of *Potato yellow vein virus* (PVV). *Journal of Virological Methods*. 136: 24-29.



- Lovisolo, O., Hull, R. and Rösler, O. 2003. Coevolution of viruses with hosts and vectors and possible paleontology. *Advances in Virus Research*. 62: 325–379.
- MacFarlane, S. and Popovich, A. 2000. Efficient expression of foreign proteins in roots from tobnavirus vectors. *Virology*. 267: 29–35.
- Mackay, I., Arden, K. and Nitsche, A. 2002. Real time PCR in Virology. *Nucleic Acids Research*. 30: 1292–1305.
- Martelli, G., Agranovsky, A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R., Dolja, V., Falk, B., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H., Wisler, G. and Yoshikawa, N. 2011. The family *Closteroviridae* revised. *Archives of Virology*. 147: 2039–2044.
- Maruthi, M., Hillocks, R., Mtunda, K., Raya, M. Muhanna, M., Kiozia, H., Rekha, A., Colvin, J and Thresh, J. 2005. Transmission of Cassava brown streak virus by *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Journal of Phytopathology*. 153: 307–312.
- Offei, S., Arciniegas, N., Müller, G., Guzmán, M., Salazar, L. and Coutts, R. 2004. Molecular variation of *Potato yellow vein virus* isolates. *Archives of Virology*. 149: 821–827.
- R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- Rodríguez, P., Chaves, G., Franco, L. and Guzmán, M. 2009. Low molecular variability of *Potato yellow vein virus* (PVYV) isolated from *Solanum phureja* and *Solanum phureja* in Colombia. Ponencia en Joint Meeting of the Florida Phytopathological Society and the American Phytopathological Society Caribbean Division. Florida.
- Salazar, L., Müller, G., Querci, M., Zapata, J. and Owens, R. 2000. *Potato yellow vein virus*. Its host range, distribution in South America and identification as a crinivirus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. *Annals of Applied Biology*. 137: 007–019.
- Sánchez-Navarro, J., Cañizares, M., Cano, E. and Pallás, V. 2007. Plant tissue distribution and chemical inactivation of six Carnation viruses. *Crop Protection*. 26: 1049–1054.
- Silvestre, R., Villamil, A., Guzmán, M., Cuellar, W. and Kreuze, J. 2012. Genetic diversity of PVY isolates infecting *Solanum* spp. In the Andes by siRNA sequencing. *Memorias del XX v Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa*.
- Singh, M. and Singh, R. 1996. Factors affecting detection of PVY in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain and nucleic acid spot hybridization. *Journal of Virological Methods*. 60: 47–57.
- Singh, M. and Singh, R. 1998. Specific detection of *Potato virus A* in dormant tubers by reverse-transcription polymerase chain reaction. *Plant Disease*. 82: 230–234.
- Schmitt, C., Mueller, A., Mooney, A., Brown, D. and MacFarlane, S. 1998. Immunological detection and mutational analysis of the RNA2-encoded nematode transmission proteins of *Pea early browning virus*. *Journal of General Virology*. 79: 1281–1288.
- Tamayo, P. y Navarro, N. 1984. Aumenta la incidencia del virus del amarillamiento de venas de la papa en Antioquia. *ASCOLFI INFORMA* (Bogotá). 19: 40–42.
- United States Department of Agriculture – Animal and Plant Health Inspection Service. 2000. Regulated plant pest list. [[http://www.aphis.usda.gov/import\\_export/plants/plant\\_imports/downloads/RegulatedPestList.pdf](http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/plant_imports/downloads/RegulatedPestList.pdf)].
- Van Hoof, H. 1980. Aphid vectors of *potato virus Y*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 86: 159–162.
- Wege, C. and Siegmund, D. 2007. Synergism of a DNA and an RNA virus: Enhanced tissue infiltration of the begomovirus *Abutilon mosaic virus* (AbMV) mediated by *Cucumber mosaic virus* (CMV). *Virology*. 357: 10–28.
- Wei, T., Lu, G. and Clover, R. 2009. A multiplex RT-PCR for the detection of *Potato yellow vein virus*, *Tobacco rattle virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* in potato with a plant internal amplification control. *Plant Pathology*. 58: 203–209.
- Yuan, J., Reed, A., Chen, F. and Stewart, C. 2006. Statistical analysis of real time PCR data. *BMC Bioinformatics*. 7(85).

# Avances en la propagación vía embriogénesis somática de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes, planta medicinal en peligro crítico

## Advances *in vitro* propagation via somatic embryogenesis of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes, medicinal plant critically endangered

Esther J. Naranjo\*, Aura I. Urrea\*\*, Lucía Atehortúa\*\*\*

### Resumen

*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae Juss), es una especie vegetal con reconocidas propiedades medicinales. Esta especie se encuentra en peligro crítico de extinción, debido a la sobreexplotación de las poblaciones naturales. Conociendo además las dificultades para su propagación por medio de semillas (debido a la baja tasa de germinación y elevada muerte prematura de las plántulas) y por vía vegetativa (lento crecimiento), el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el potencial de propagación vía embriogénesis somática directa. Segmentos de hojas jóvenes de plantas mantenidas en casa malla fueron desinfectados y sembrados en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog) suplementado con diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento. Las combinaciones IBA y BAP a 1 y 2 mg/L y 2 y 1 mg/L, respectivamente; mostraron ser efectivas en la formación de embriones somáticos en esta especie. La procedencia de la planta donadora parece tener influencia en la sensibilidad del tejido foliar a la respuesta. Este es el primer reporte de embriogénesis somática directa para esta especie y el primer reporte de cultivo *in vitro* de poblaciones colombianas.

**Palabras clave:** micropropagación, conservación, nativa, extinción, regeneración *in vitro*.

### Abstract

*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae Juss), is a specie with known medicinal properties. This species is critically endangered due to overexploitation of natural populations.

Besides knowing the difficulties in propagation by seed (due to the low rate of germination and high seedling premature death) and by vegetative (slow growth), the present study evaluated the potential for propagation by using direct somatic embryogenesis.

Young leaves segments from plants cultivated in a greenhouse were disinfected and planted in MS medium (Murashige y Skoog), supplemented with different concentrations of growth regulators. IBA and BAP combinations at 1 and 2 mg / L and 2 and 1 mg / L, respectively, shown to be effective in the formation of somatic embryos in this species. The origin of the donor plant seems to influence foliar tissue sensitivity to the answer. This is the first report of direct somatic embryogenesis for this species and the first report of *in vitro* culture of Colombian populations.

**Key words:** micropropagation, conservation, native species, *in vitro* regeneration.

**Recibido:** agosto 20 de 2013

**Aprobado:** mayo 6 de 2014

### Introducción

Las plantas medicinales son un componente importante de la biodiversidad, en la actualidad la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en ingles), es-

tima que estas, son la fuente principal para la atención primaria en salud en por lo menos el 75 u 80% de la población mundial (WHO, 2007, Siahsar B. *et al.*, 2011; Kunle *et al.*, 2012; Hong-Wen *et al.*, 2012;). Además, se estima que cerca del 25 al 30% de las medicinas

\* MSc., Instituto de Biología, Universidad de Antioquia (Medellín), Colombia. enaranjo@matematicas.udea.edu.co

\*\* PhD. en Ciencias, Docente Instituto de Biología, Universidad de Antioquia (Medellín), Colombia. aurea@matematicas.udea.edu.co

\*\*\* PhD. en Ciencias, Docente Instituto de Biología, Universidad de Antioquia (Medellín), Colombia. latehor@gmail.com

modernas son directa o indirectamente derivadas de plantas superiores. (Kumari S. *et al.*, 2011; Hong-Wen *et al.*, 2012).

De hecho, el mercado y la demanda de productos naturales para el cuidado de la salud, se ha incrementado de tal forma, que ha hecho que muchas plantas medicinales, enfrenten el peligro de la pérdida de diversidad genética o incluso se encuentren en peligro de extinción (Hoareau y Da Silva 1999).

*P. ipecacuanha*, es una de estas plantas medicinales en peligro de extinción, debido principalmente a la sobreexplotación y pérdida de su hábitat natural, (Alvez Garcia *et al.*, 2005). También conocida como “ipeca” o “raicilla”, pertenece a la familia rubiácea, crece en el bosque húmedo tropical y se encuentra distribuida en América Central en Nicaragua, Costa Rica y Panamá y en Sur América en Brasil y Colombia (Alvez Garcia *et al.*, 2005; Nomura y Kutchan 2010). El extracto de la raíz es utilizado y reconocido en la farmacopeia, entre otros como amebicida, emético, y expectorante (Akinboye y Bakare 2011; Nomura y Kutchan 2010; Brandao *et al.*, 2008; Ideda *et al.*, 1988).

*P. ipecacuanha*, presenta dificultades en la propagación por semilla, ya que pierden fácilmente su viabilidad después de la recolección, (Chatterjee *et al.*, 1982; citado por Satoko *et al.*, 2007), presentan pobre germinación, crecimiento lento y muerte prematura de las plántulas en condiciones naturales (Rout *et al.*, 2000; Jha y Jha 1989). La propagación por vía vegetativa tiene como limitante el lento crecimiento de las plantas. Consecuentemente, hay una urgente necesidad de contar con un protocolo de propagación masiva que permita obtener material vegetal con miras a la reintroducción en su hábitat y además contar con material seleccionado (por su contenido de alcaloides principalmente) para el establecimiento de cultivos comerciales.

Las técnicas de cultivo *in vitro*, entre ellas la embriogénesis somática, se presentan como una alternativa para la propagación masiva y la conservación de especies amenazadas, raras y/o endémicas (Philip Robinson *et al.*, 2009). Esta técnica, tiene entre otras ventajas frente a la micropropagación convencional la generación de plántulas con meristemo apical y radicular simultáneamente, por lo que no se requiere una etapa de enraizamiento posterior, además de la facilidad para su escalamiento, menor probabilidad de variación genética, entre otras, (Khadke y Kuvalekar 2013; Aiqing Ji *et al.*, 2011; Philip Robinson *et al.*, 2009). A pesar de estas ventajas, este proceso debe ser estandarizado teniendo en cuenta la respuesta diferencial de cada genotipo a los reguladores de crecimiento, al tipo de explante, la edad de la planta donadora y las condiciones de crecimiento entre otros factores (Aiqing Ji *et al.*, 2011).

La embriogénesis somática ha sido reportada para *Cephaelis ipecacuanha* por Rout *et al.* (2000) quienes describen la obtención de embriones somáticos indirectos y la obtención de vitroplantas a partir de los embriones formados; además, Lara *et al.* (2003), describen la obtención de brotes y embriones directos e indirectos a partir de explantes foliares en *P. acuminata*.

En Colombia, a pesar de ser uno de los pocos países de distribución de la esta especie, no existen trabajos sobre aspectos tan importantes como la fenología, la propagación sexual y asexual, conservación *in situ* y *ex situ*, entre otros.

Conociendo las ventajas de la propagación *in vitro* y teniendo en cuenta la importancia de esta especie medicinal desde el punto de vista de su potencial uso sostenible y conservación, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento sobre las diferentes etapas de la embriogénesis somática en poblaciones colombianas de *P. ipecacuanha*.

## Materiales y métodos

### Material vegetal y condiciones de cultivo

El material vegetal de *P. ipecacuanha* fue colectado en el Urabá antioqueño en tres salidas de campo de acuerdo al “Contrato No.50 de Acceso a Recursos Genéticos sin interés Comercial”.

Hojas jóvenes de la parte apical, provenientes de plantas mantenidas en condiciones semicontroladas en casa malla, fueron colectadas y desinfectadas mediante lavado con agua corriente durante 15 min. y un lavado con Tween 20 al 5% durante 5 min.; seguido por una inmersión en fungicida más antibiótico (Benomyl® y estreptomycin, 2 g/L cada uno), por 2 horas y luego en hipoclorito de sodio (NaClO) 3%, por 30 min., finalmente se realizó una segunda desinfección en NaClO al 1,6%. Después de cada paso se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril. Las hojas desinfectadas fueron cortadas en segmentos de 0,8 cm<sup>2</sup> aproximadamente y llevadas al medio de cultivo. Todo el proceso se realizó bajo un ambiente estéril en cámara de flujo laminar horizontal.

Todos los medios de cultivo, fueron preparados con agua destilada y homogenizados con agitación constante. El pH inicial fue ajustado a 5,75 con NaOH y/o HCl 1N, antes de su autoclavado, y gelificados con 2,8 g/L de gelrite (Phytotech). Los medios de cultivo fueron esterilizados durante 20 min., a 121°C y 15 psi.

La composición del medio de cultivo para todos los tratamientos fueron las sales basales de Murashige y Skoog (1962), a la mitad de su concentración supe-

mentado con sacarosa (20 g/L), adenina (200 mg/L) y glutamina (50 mg/L).

### Inducción del proceso embriogénico

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en ensayos preliminares donde se evaluaron combinaciones de reguladores de crecimiento que fueron exitosos para esta especie (Rout *et al.*, 2000), en especies relacionadas (Lara *et al.*, 2003 a y b) y otras combinaciones propuestas con base en la experiencia en otras especies; se plantearon en el medio basal MS los siguientes tratamientos (mg/L), **M1**: IBA 3,0 más BAP 1,5; **M2**: IBA 2, más BAP 1; **M3**: IBA 1,0 más BAP 0,5; **M4**: IBA 1,5 más BAP 3,0; **M5**: IBA 1,0 más BAP 2,0 y **M6**: IBA 0,5 más BAP 1,0.

El tamaño de la muestra consistió entre 10 y 15 segmentos de hoja por tratamiento, sembrados individualmente en cajas de Petri.

Los explantes fueron mantenidos a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  y bajo dos condiciones lumínicas, oscuridad constante y fotoperiodo, 16/8 horas luz/oscuridad. Además se tuvo en cuenta la procedencia de los explantes (poblaciones muestreadas P1, P2, P3 y P4), con el fin de evaluar el efecto de estos dos factores sobre la respuesta al cultivo *in vitro*. La colecta de material vegetal, se realizó en municipios del Urabá antioqueño, específicamente en poblaciones encontradas en Turbo y Carepa.

Las variables registradas cada 30 días fueron: Necrosis o muerte del tejido, formación o no de callo y tipo de callo: Embriogénico (E) y No Embriogénico (NE) en porcentaje, textura y color de los mismos.

### Evaluación del potencial de regeneración

Los callos embriogénicos y embriones obtenidos (figura 2) después de cuatro meses, fueron trasladados al mismo medio de cultivo basal conteniendo dos concentraciones de BAP: 0.5 y 2 mg/L, respectivamente. El material fue mantenido a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , bajo condiciones de fotoperiodo (16/8 horas luz/oscuridad).

Se utilizaron 10 cajas de Petri (15x60 mm.) cada una con un clúster embriogénico para un total de 10 clúster embriogénicos por tratamiento. Cada clúster o porción de callo embriogénico tuvo un tamaño aproximado de 1 cm<sup>2</sup>. Se registró cada mes el desarrollo de ejes caulinares a partir de los embriones y la formación o no de raíces.

### Diseño experimental y análisis estadístico

Teniendo en cuenta que los datos no se ajustaron a una distribución normal, se aplicaron pruebas no paramétricas. El efecto de las condiciones lumínicas (fotoperiodo y oscuridad constante) y la procedencia del material fueron evaluados mediante tablas de contingencia, contabilizando el número de explantes que

produjeron callo E y NE. Esta información fue analizada con base en los residuales de Pearson y el valor *P* calculado mediante una prueba  $\chi^2$ , usando, en el programa estadístico R, el paquete vcd y la función assoc() (Logan 2010).

### Resultados y discusión

Los segmentos de hoja de plantas de diferentes procedencias (coordinadas geográficas), presentaron una respuesta diferencial al cultivo *in vitro* (figura 1), en los tratamientos evaluados para la inducción del proceso embriogénico.

La formación de callo embriogénico se presentó en todos los tratamientos evaluados, pero solo con una de las procedencias, igualmente la formación indirecta de embriones somáticos se logró solo en esta procedencia en los tratamientos M1, M2 y M3, aunque en baja proporción (figura 1); lo que nos permite sugerir que además del efecto de las concentraciones de los reguladores de crecimiento, la procedencia del material vegetal y la condición lumínica, tienen un efecto importante en la respuesta de esta especie al cultivo *in vitro*.

La respuesta obtenida en ensayos previos cuando se utilizó el 2,4 D como auxina y kinetina como citoquinina, no fue favorable para el proceso embriogénico, obteniéndose solo un callo húmedo, oscuro y no embriogénico. Este resultado no coincide con lo descrito por Rout *et al.* (2000) para esta misma especie, quienes describen la formación indirecta de embriones somáticos encontraron su posterior regeneración. Tampoco se logró la formación de embriones somáticos con la combinación de reguladores de crecimiento BAP y ANA, utilizada por Lara *et al.* (2003a y 2003b) en *P. acuminata* con la cual obtuvieron formación de embriones de manera directa.

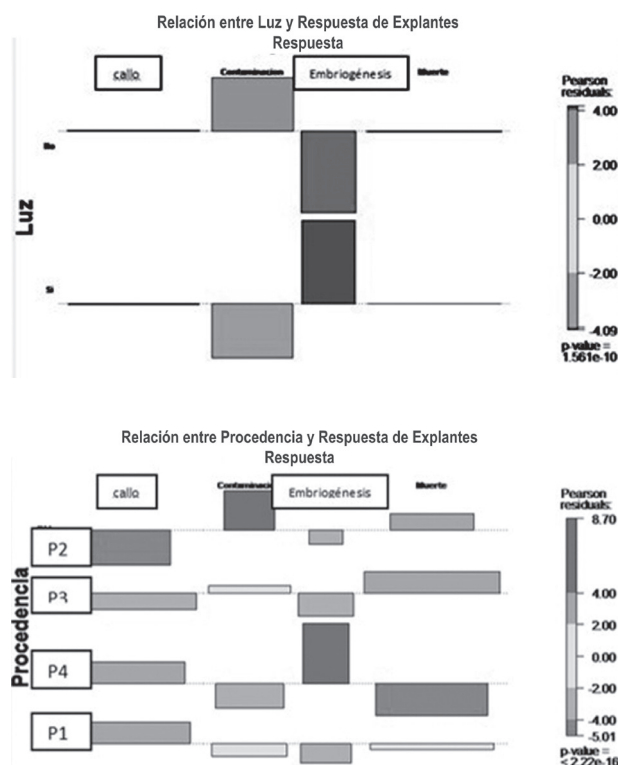
Otras combinaciones evaluadas en los ensayos preliminares de esta investigación (con base en la experiencia del grupo de investigación) fueron 2,4-D más 2iP o BAP e IBA más 2iP o BAP logrando con esta última combinación la mejor respuesta y por tanto planteada como base para la matriz evaluada.

Berros *et al.* (2005), reportan embriogénesis somática en avellana (*Corylus sp.*), con esta misma combinación de reguladores de crecimiento y describen la participación del IBA en la promoción de la inducción de los embriones y del BAP en la promoción del desarrollo en los primeros subcultivos y como principal agente durante el desarrollo polarizado. La adición de BAP en varias combinaciones y concentraciones en subcultivos consecutivos, facilitó la inducción embriogénica en los explantes. Otros autores describen el efecto de esta misma combinación de reguladores de crecimiento en especies como: *Onobrychis sativa*, (Mohajer *et al.*, 2012) y *Solanum melongena*, (Kahur *et al.*, 2013).



El análisis de las tablas de contingencia mostro que la procedencia y la condición lumínica, tienen un efecto estadísticamente significativo ( $P<0,05$ ), sobre la formación de callo E y NE (figura 1).

La figura 2, muestra los resultados obtenidos para diferentes procedencias, tanto en la formación de callo, como para la formación de embriones. La procedencia 2 no presentó respuesta en ninguno de los tratamientos, mientras que las procedencias 1, 3 y 4 presentaron respuesta a la formación de callo NE en casi todos los tratamientos y solo la P4 respondió a la formación de CE y de embriones (figura 2). Este resultado coincide con lo descrito por Lara et al. (2003), en la especie *P. acuminata*, quienes encontraron respuesta diferencial a la proliferación de brotes, de material proveniente de diferentes zonas geográficas. En este mismo sentido, Pakhomov et al. (2005 y 2004), reportan alta capacidad embriogénica de cultivares de soya, (*Glycine max* (L.) Merr.), procedentes de unas zonas geográficas y muy baja capacidad embriogénica de estos cultivares procedentes de otras zonas geográficas. Contrario a nuestros resultados, Ahmad et al. (2011), reportan que la procedencia no tuvo efecto significativo en la germinación de semillas y la respuesta embriogénica a partir de estas en *Picea abies*; resultados similares a este último se han descrito para algunas especies de *Quercus*, (Timofte et al., 2011).



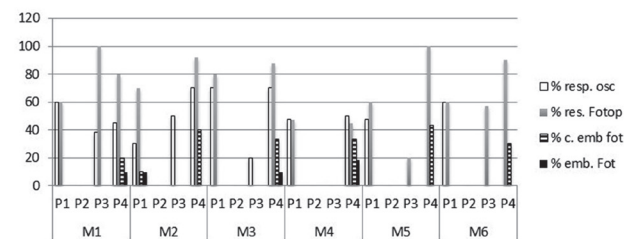
**Figura 1.** Tablas de contingencia. Respuesta diferencial según la procedencia y la condición lumínica a la embriogénesis ( $P<0,05$ ).

Se encontró además, que las condiciones de luz tuvieron un efecto en la respuesta embriogénica de esta especie, la cual se obtuvo solo en condiciones de fotoperiodo. En la figura 2, se observa que la formación de callo siempre fue igual o superior en condiciones de fotoperiodo y que además la formación de CE y embriones somáticos solo se presentó en esta condición; no hubo formación de CE, ni embriones somáticos en condiciones de oscuridad.

Lo anterior nos permite sugerir, que la luz juega un papel importante en la respuesta embriogénica de la especie en estudio. Hoshino y Cuello (2006), coinciden en que las condiciones de iluminación son uno de los factores ambientales críticos que tienen efecto sobre la inducción de embriogénesis somática. Resultados similares han sido reportados para especies como caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), (Ali et al., 2007) y canola (*Brassica napus*), (Angoshtari et al., 2009); en las cuales solo los explantes en condiciones de fotoperiodo, presentaron respuesta embriogénica.

Sin embargo, Gatica et al. (2008), evaluaron tres condiciones de iluminación y encontraron un buen promedio de formación de embriones por explante, tanto en condiciones de oscuridad como de fotoperiodo y el más bajo se reportó en condiciones de iluminación continua; Tangolar et al. (2008), reportan la formación de embriones somáticos en *Vitis spp*, tanto en condiciones de oscuridad como de fotoperiodo, sin embargo, la mejor eficiencia fue obtenida en condiciones de oscuridad. Contrario a nuestros resultados, Triqui et al. (2008) reportan la obtención de embriones somáticos solo en condiciones de oscuridad para *Ipomoea batatas*.

Varios autores han descrito el efecto de las condiciones de iluminación sobre la inducción de embriones somáticos y/o la respuesta al cultivo *in vitro*. Kintzios et al. (1998), revisan el efecto de las condiciones de iluminación sobre varias especies y confirman su efecto sobre la inducción y proliferación de embriones somáticos en la mayoría de las especies evaluadas, la incubación en la oscuridad o a bajas intensidades de iluminación favorece la embriogénesis somática,



**Figura 2.** Respuesta de segmentos de hojas de *P. ipecacuanha* a formación de callo y embriones somáticos en función de la concentración de reguladores (Medios de cultivo M1, M2, M3, M4, M5, M6), la procedencia del material vegetal (P1, P2, P3, P4) y la condición de luz (Osc: oscuridad y Fot.: fotoperiodo).

además resaltan diferencias del efecto de la condición lumínica sobre la proliferación de embriones en especies hortícolas en relación con especies ornamentales.

Otros autores describen además, el efecto de la iluminación sobre el desarrollo y la inducción de brotes, en diferentes especies, y que cambios en la condiciones y/o intensidades de iluminación tienen diferentes efectos morfogénicos sobre el desarrollo en especies no relacionadas, lo que sugiere que la morfogénesis y la embriogénesis somáticas son mediadas en forma específica, en las diferentes especies de plantas (Kurilcik et al., 2008; Hataa et al., 2012; Marks y Simpson 1999).

Nuestros resultados y los reportados por otros autores confirman la influencia de los factores ambientales sobre la embriogénesis somática y por lo tanto, la necesidad de evaluarlos en el momento de trabajar con una especie nueva o incluso para variedades (genotipos) dentro de una misma especie. Los factores ambientales que prevalecen en las condiciones *in vivo*, pueden ser usados como referente de los requerimientos para el crecimiento en condiciones *in vitro*. El estudio de estos factores es necesario no solo en la embriogénesis somática, sino en todos los procesos *in vitro* de las diferentes especies, con el objetivo de establecer protocolos repetibles para la producción exitosa y el establecimiento y mantenimiento de los cultivos.

### **Evaluación del potencial de regeneración**

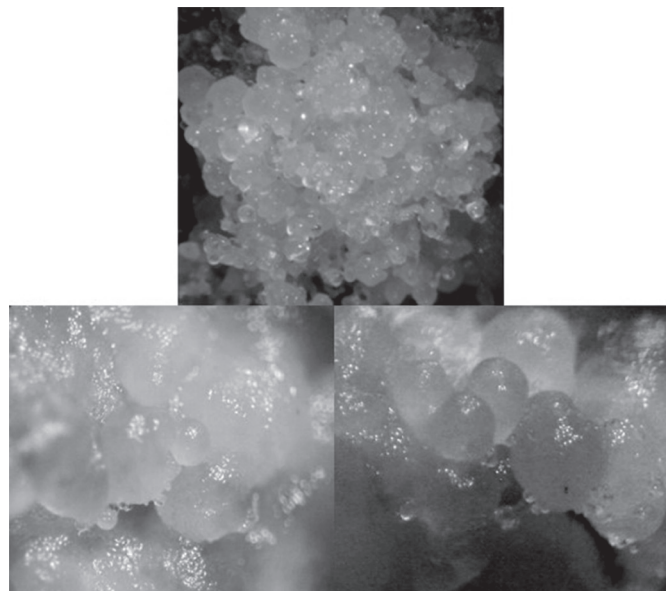
Los mejores resultados se registraron en el medio de cultivo conteniendo BAP a 0.5 mg/L, en el cual se obtuvo entre 2-10 regenerantes por clúster embriogénico, mientras que en el tratamiento con BAP a 2.0 mg/L solo se obtuvieron 1-2 regenerantes por clúster. Es importan-

te destacar que el inicio de la conversión de los embriones se alcanzó después de 20 días de ser transferidos al medio de regeneración, sin embargo la respuesta de desarrollo es lenta, alcanzando una altura de 1cm. aproximadamente después de 60 días (figura 3). Contrario a nuestros resultados, Rout et al. (2000), reportan una mayor germinación de embriones somáticos de esta especie en el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento, lo cual en el presente trabajo desencadenó la necrosis y muerte de los callos y embriones.

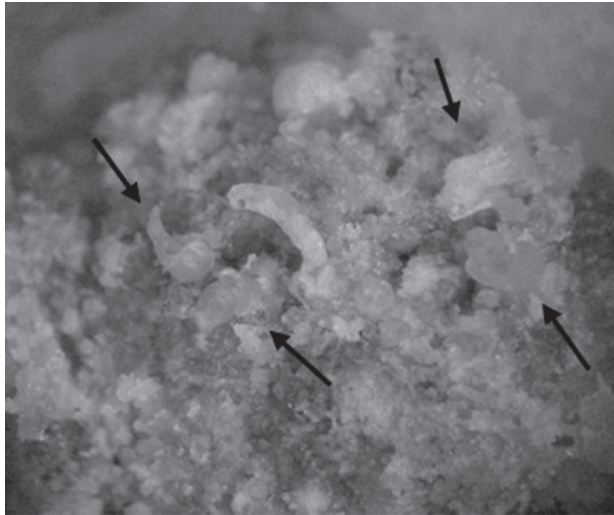
Esta es la etapa inicial de la evaluación del proceso de conversión hasta planta completa en poblaciones colombianas de *P. ipecacuanha*.

### **Conclusiones**

A pesar de la importancia medicinal de *P. ipecacuanha*, del alto impacto sobre las poblaciones naturales y de las desventajas propias de la conservación *in situ*, son casi nulos los grupos de investigación que trabajan en la búsqueda de alternativas de conservación de esta especie. Para Colombia no se registran trabajos. Los resultados obtenidos a la fecha, nos permiten sugerir que la procedencia (coordenadas geográficas) y las condiciones de luz durante el cultivo en laboratorio, tienen un efecto importante sobre la respuesta de esta especie al cultivo *in vitro*. Es necesario realizar ensayos con otras condiciones ambientales (intensidad lumínica, temperatura, entre otras) y combinaciones de reguladores de crecimiento que nos permitan avanzar y optimizar la propagación vía embriogénesis somática. Este es el primer reporte sobre el cultivo *in vitro* de una especie nativa de Colombia en peligro crítico, se continua con ensayos de regeneración a partir de embriones somáticos y otros explantes, además se están



**Figura 3.** Callo embriogénico y embriones somáticos obtenidos a partir de explantes foliares de *P. ipecacuanha*.



**Figura 4.** Regenerantes obtenidos a partir de embriones somáticos transferidos a medio basal conteniendo 0.5 mg/L de BAP

desarrollando trabajos de conservación *in vitro* y marcadores moleculares para esta especie. Todo lo anterior con miras en un mediano plazo al desarrollo de un programa de conservación *ex situ*, uso sostenible y/o reintroducción en su hábitat.

### Agradecimientos

A Colciencias por la financiación del proyecto de investigación. Al CODI-Estrategia de Sostenibilidad 2013-2014, Universidad de Antioquia por el apoyo al Grupo de Biotecnología. Finalmente, agradecemos al profesor Camilo Ramírez, por su asesoría en el análisis estadístico.

### Referencias bibliografías

Ahmad I., Johansson S., Andrade G., Dedicova B. and Egertsdotter U. 2011. Somatic embryogenesis for mass propagation of elite Spruce families: effect of storage time on somatic embryogenesis initiation. *BMC Proceedings*. 5(7): 127.

Aiqing J., Xueqing G., Yan Z., Hongyan Y. and Guoliang W. 2011. Advances in Somatic Embryogenesis Research of Horticultural Plants. *American Journal of Plant Sciences*. 2: 727-732.

Akinboye E. and Bakare O. 2011. Biological activities of emetine. *The Open Natural Products Journal*. 4: 8-15.

Ali A., Naz S. and Iqbal J. (2007). Effect of different explants and media compositions for efficient somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Pakistan Journal Botany*. 39(6): 1961-1977.

Alves García R., Oliveira L., Alves Moreira M. and Silva Barros W. 2005. Variation in emetine and cephaeline contents in roots of wild Ipecac (*Psychotria ipecacuanha*). *Biochemical Systematics and Ecology*. 33: 233-243.

Angoshtari R., Tavakkol Afshari R., Kalantari S. and Omid M. 2009. Effects of abscisic acid on somatic embryogenesis and induction of desiccation tolerance in *Brassica napus*. *Asian Journal of Plant Science*. 8(4): 276-284.

Berros B., Rey M., Díaz-Sala C., Albuerne M. and Rodríguez R. 1995. Somatic embryogenesis in Hazelnut (*Corylus* Species). In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry 30 – Somatic Embryo-*

genesis and Synthetic Seed I. Bajaj, Y.P.S. eds. Springer\_Verlag. New York. pp. 318-334.

Brandão M., Zanetti N., Oliveira A., Graell C., Santos A. and Monte-Mór R. 2008. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology*. 120: 141-148.

Chatterjee K., Nandi, P. and Ghosh C. 1982. Cultivation and utilization of ipecac In West Bengal. In: Atal, C.K.; Kapur, B. M. eds. *Cultivation and utilization of medicinal plants*. Jammu-Tawi, India: CSIR, Regional Research Laboratory. pp 295-301.

Gatica A. M., Arrieta G. and Espinosa A.M. 2008. Direct somatic embryogenesis in *coffea arabica* l. cvs. Caturra and catuaí: effect of triacontanol, light condition and medium consistency. *Agronomía Costarricense*. 32(1):139-147.

Hataa N., Hayashia Y., Okazawaa A., Onob E. Satakec H. and Kobayashi A. 2012. Effect of photoperiod on growth of the plants, and sesamin content and CYP81Q1 gene expression in the leaves of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Environmental and Experimental Botany*. 75: 212- 219.

Hoareau L. and Da Silva E. 1999. Medicinal plants: a re-emerging health aid. *Electronical Journal Biotechnology*. 2: 56-71.

Hong-Wen Gao, Dong-Dong Ma and Gang Xu. 2012. Medicinal plant acid-treatment for a healthier herb tea and recycling of the spent herb residue. *The Royal Society of Chemistry*. 2: 5983-5989.

Hoshino T. and Cuello J. 2006. Environmental design consideration for somatic embryogenesis. *Plant Cell Monograph* (2) Mujib A and Samaj J (Ed.). *Somatic Embryogenesis*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 357.

Ideda K., Teshim, D., Aoyama T., Satake M. and Shimomura K. 1988. Clonal propagation of *Cephaelis ipecacuanha*. *Plant Cell Reports*. 7:288-291.

Jha S. y Jha T. 1989. Micropropagation of *Cephaelis ipecacuanha* Rich. *Plant Cell Reports*. 8:437 439.

Kaur M., Singh D., Ajmer S., Sandhu J., Singh Sidhu A. and Singh G. 2013. Effect of media composition and explant type on the regeneration of eggplant (*Solanum melongena* L.). *African Journal of Biotechnology*. 12(8): 860-866.

Khadke S. and Kuvalekar A. 2013. Direct Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Leaf and Stem Explants of *Nothapodytes foetida*: A Critically Endangered. *Plant Species. International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*. 3(1): 257-264.

Kintzios S. E., Hiureas G., Shortsiannis E., Sereti E., Blouhos P., Manos C., Makri O., Taravira N., Drossopoulos J. B. and Holveas C. D. 1998. The effect of light on the induction, development and maturation of somatic embryos from various horticultural and ornamental species. *Acta Horticulturae (ISHS)*. 461:427-432.

kumari Sangita, Shukla Govind and Sambasiva Rao A. 2011. The Present Status of Medicinal Plants – Aspects and Prospects. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 2(1): 11-22.

Kunle Oluyemisi, Folashade Egharevba, Omorieg Henry and Ahmadu Peter Ochogu. 2012. Standardization of herbal medicines - A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*. 4(3): 101-112.

Kurilcik A., Dapkuniene S., Kurilcik G., Žilinskaite S., Žukauskas A. and Duchovskis P. 2008. Effect of the photoperiod duration on the growth of *Chrysanthemum* plantlets *in vitro*. *Scientific Works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture*. 27(2): 76-81.

Lara A., Valverde R. y Gómez L. 2.003. (a). Histología de Embriones Somáticos y Brotes Adventicios Inducidos en Hojas de *Psychotria acuminata*. *Agronomía Costarricense*. 27(1): 37-48.

Lara A., Valverde R. y Gómez L. 2.003. (b). Micropropagación de la planta medicinal *Psychotria acuminata*. *Agronomía Costarricense*. 27(2): 7-20.

Logan M. 2010. *Biostatistical design and analysis using R*. UK: Wiley-Blackwell, Inc. p. 546.

- Marks T.R. and Simpson S.E. 1999. Effect of irradiance on shoot development *in vitro*. *Plant Growth Regulation*. 28: 133-142.
- Mohajer Sadegh, Mat, Taha Rosna, Khorasani Arash and Syafawati Yaacob Jamilah. 2012. Induction of different types of callus and somatic embryogenesis in various explants of Sainfoin (*Onobrychis sativa*). *Australian Journal of Crop Science*. 6(8):1305-1313.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Nomura T. and Kutchan T. 2010. Three new o-methyltransferases are sufficient for all o-methylation reactions of ipecac alkaloid biosynthesis in root culture of *Psychotria ipecacuanha*. *The Journal of Biological Chemistry*. 285 (10): 7722-7738.
- Rout G.R., Samantaray S., and Das P. 2000. *In vitro* somatic embryogenesis from callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Scientia Horticulturae*. 86: 71-79.
- Pakhomov A.V., Emets A.I., Hu C.Y. and Blum B. 2004. Evaluation of embryological potential of soybean cultivars zoned in forest, steppe, and marshy woodlands of Ukraine as essential stage for the further transformation. *Tsitol Genetic*. 38(1):49-54.
- Pakhomov A.V., Emets A.I. and Blum B. 2005. Comparative analysis of embryogenic potential of soybean cultivars zoned in different ecogeographic world regions. *Tsitol Genetic*. 39(5): 20-7.
- Philip Robinson, Jayachandran Britto S. John and Balakrishnan V. 2009. Regeneration of Plants Through Somatic Embryogenesis in *Emilia zeylanica* C. B. Clarke a Potential Medicinal Herb. *Botany Research International*. 2 (1): 36-41.
- Rout G.R. Samantaray S. and Das P. 2000. *In vitro* somatic embryogenesis from callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Scientia Horticulturae*. 86: 71-79.
- Satoko I., Kaori, T. y Koichiro, S. 2007. Gibberellic acid improved shoot multiplication in *Cephaelis ipecacuanha*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 44(3): 216-220.
- Siahsar B, Rahimi M, Tavassoli A, Raissi AS (2011) Application of Biotechnology in Production of Medicinal Plants. *Journal Agriculture & Environmental Science*. 11(3): 439-444.
- Tangolar SG, Buyukalaca S, Ergenoglu F. 2008. High efficiency somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of grapevine: the effect of genotype, media, 2, 4-d, and incubation conditions. *Turkey Journal Agriculture Forestry*. 32: 311-317.
- Timofte A.I., Pamfil D., Palada-Nicolau M. and Timofte N.S. 2011. The effect of different factors upon the *in vitro* propagation in *Quercus robur* and *Q. frainetto* by Somatic Embryogenesis. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 39(1): 288-291.
- Triqui Z.A, Guedir A, Chlyah, A., Chlyah H., Souvannavong V., Haicour R., Sihachakr D. 2008. Effect of genotype, gelling agent, and auxin on the induction of somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). *Comptes Rendus Biologies*. 331: 198-205.
- World Health Organization. 2007. WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. *WHO Press. España*.



# Primera incursión en la obtención de curieles libre de patógenos específicos en Cuba

## First foray into the production of specific pathogen-free guinea pigs in Cuba

*Bárbara O González Navarro\**, *Cándida Forte Miranda\*\**, *Ramón Alonso Rojas†*,  
*Antonio Alfonso Montero\*\*\**, *Liliana Francis Turner\*\*\*\**, *María Elena Arteaga Pérez\*\*\*\*\**,  
*Layna Riera Ojeda\*\*\*\*\**

### Resumen

Resultados confiables y económicos solo son obtenidos cuando los animales de experimentación son aislados de factores ambientales y biológicos, implantándose en el biomodelo una microbiota normal, lejos de la presencia de microorganismos patógenos. El objetivo de la investigación fue obtener curieles libre de patógenos específicos por cesárea aséptica, mantenidos en aisladores y alimentados con dietas estériles. Se realizaron 26 histerectomías. Los animales fueron alimentados con una fórmula modificada (L-477) en forma de papilla hasta los 21 días y permanentemente después la C-484 sólida y granulada, esterilizadas a 121°C/20 minutos o a 1,5Mrad. Además fueron suplementados con vitamina C y B1. El forraje o heno fue consumido a partir de la primera generación. La microbiota gastrointestinal se administró por vía oral en 0,5 ml de una dilución de 10<sup>-6</sup>/g de contenido de la porción final del íleon, ciego y principio del colon de curieles, a las 24 y 48 horas del nacimiento. Se utilizó para el monitoreo microbiológico caldo Tioglicolato, caldo Triptona Soya y caldo Saboraud incubados aeróbicamente a temperatura de 55, 37 y 25°C respectivamente. Se obtuvieron 51 neonatos. La mortalidad más alta se registró entre los primeros 10 días de edad (58,8%). Se lograron 12 animales (3 machos y 9 hembras), 6 de las hembras se reprodujeron aproximadamente a los 9 meses de edad, lográndose 11 crías por parto normal. La metodología aplicada permitió obtener curieles libres de *Salmonella* sp, *Pasteurella* sp, *Streptococcus* del tipo A y C, *Bordetella bronchiseptica*, *Toxoplasma gondii*, Virus Sendai y parásitos internos y externos.

**Palabras clave:** curieles, libre de patógenos específicos, aisladores, histerectomía y dietas estériles.

### Abstract

Confidence and economics results are only obtained when the animals are isolated of the environmental and biological factors, that could interfere the course of from investigation and when is being established in them, a normal microflora balanced far from the presence of pathogen microorganisms. They were accomplished 26 hysterectomies. The animals were fed with a modified formula of L-477 in the form of porridge until 21 days of age and permanently after with the C-484 solid and granulated, sterilized at 121°C/20 minutes or 1,5Mrad. The forage or hay was consumed by the first generation since the 6 months of age. The gastrointestinal flora was administered by oral route with 0,5 ml of a dilution of 10<sup>-6</sup>/g of the contents of the ileum final portion, cecum and first part of the colon of conventionalized Dunkin Hartley guinea pigs, at 24 and 48 hours born. It was used for microbiological bacteria monitoring Thioglycolate broth, Tryptic Soy broth and Sabouraud broth incubated aerobically at temperatures of 55, 37 and 25°C respectively. There were obtained 51 newborns. The highest

\* PhD. Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio. CENPALAB. Calle 3ra N° 40759 entre 6ta y Carretera Tirabeque, Reparto La Unión, Boyeros, La Habana. Cuba. barbara.gonzalez@cenpalab.inf.cu

\*\* MSc. CENPALAB. candida.forte@cenpalab.inf.cu

† MV. CENPALAB. Fallecido

\*\*\* MV. CENPALAB. antonio.alfonso@cenpalab.inf.cu

\*\*\*\* PhD. Universidad de Tolima, Ibagué, Tolima, Colombia. lily\_colcuba@gmail.com

\*\*\*\*\* MSc. CENPALAB. melena@cenpalab.inf.cu

\*\*\*\*\* PhD. CENPALAB. layna.riera@cenpalab.inf.cu

mortality was registered during the first 10 days of age (58,8%). There were archived 12 animals: 9 female and 3 males. 6 of the female were reproduced approximately at 9 months of age and were archived 11 normal delivery sucklings. There were obtained guinea pigs free of the followings specific pathogens: *Salmonella* sp., *Pasteurella* sp., *Streptococcus* of the group A y *C. Bordetella bronchiseptica*, *Toxoplasma gondii*, Sendai Virus, beside internal and external parasites.

**Key words:** guinea pigs, specific pathogen free, isolators, hysterectomy and sterile diets.

**Recibido:** agosto 5 de 2013

**Aprobado:** abril 25 de 2014

## Introducción

El primer animal mantenido en condiciones Libres de Gérmenes (GF) fue el curiel, obtenido por Nuttall y Thierfelder (1895, 1896 y 1897) empleando el método de histerectomía aséptica. Los animales sobrevivieron durante 13 días aproximadamente en una campana de cristal preparada para tales efectos (Wagner y Foster 1976).

Esta especie al nacimiento presenta un buen desarrollo corporal, sus ojos y el canal auditivo están abiertos, el cuerpo cubierto de pelos, a las pocas horas corretea por las jaulas y es capaz de ingerir los alimentos que se les suministran a sus padres. Puede alimentarse con dietas semisólidas y sólidas, no necesitando de fórmulas de leche artificial, estas características hicieron posible que el curiel llegara al reino de la Gnotobiología como la primera especie (Wagner y Foster 1976).

El uso de animales convencionales muchas veces causan costosas pérdidas económicas y consumen tiempo en la repetición de los experimentos al portar organismos patógenos potenciales, los cuales causan manifestaciones clínicas de enfermedad cuando son sujetos a procedimientos de investigación (Festing 2010).

El interés de producir animales libre de patógenos específicos (SPF) en la década de 1980 se hizo una necesidad aparejada al desarrollo científico técnico de las investigaciones biomédicas que ya daba sus primeros pasos en la producción de vacunas y productos biotecnológicos, aportando resultados confiables y reproducibles al país. Entonces se funda el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), encargado de investigar, producir y comercializar todo lo referente a esta ciencia. Como tal participa en el desarrollo de la biotecnología en los subprogramas de bioplaguicidas, en el impulso y aplicación de los anticuerpos monoclonales de uso humano (Martínez 2008).

En 1984 se iniciaron las primeras investigaciones en condiciones gnotobióticas. Las primeras especies en las que se incursionó en orden cronológico fueron: curieles, ratones, ratas, conejos y aves mantenidas en aisladores flexibles y rígidos, además en macroaisladores con escafandra que fueron de producción nacional (Molinete *et al.*, 1988; Francis *et al.*, 2001; Forte *et al.*, 2001).

El presente trabajo tiene como objetivo describir las técnicas gnotobióticas empleadas por primera vez en

Cuba para la obtención de curieles libre de patógenos específicos a través de cesárea aséptica, mantenidos en aisladores y alimentados con dieta artificial estéril.

## Materiales y métodos

### *Procedencia, ética y bienestar animal*

Los curieles de la línea Dunkin Hartley no consanguínea utilizados en esta investigación procedieron del CENPALAB. Los animales se alojaron y alimentaron en las instalaciones de ensayo pertenecientes a la Dirección de Animales Gnotobióticos según lo establecido en la Guía de Buenas Prácticas para el Cuidado, Uso y Reproducción de los Animales de Laboratorio y los Procedimientos Operacionales de Trabajo. A su vez el protocolo de investigación fue inspeccionado y aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación de dicha institución teniendo en consideración la protección del bienestar animal, el control del estrés, el dolor y el punto final humanitario.

### *Técnica de histerectomía y mantenimiento de los neonatos obtenidos por cesárea*

Veintiséis madres preñadas fueron histerectomizadas al determinar por palpación la separación aproximada de 16 mm o más de los huesos del pubis necesaria para la expulsión (Phillips *et al.*, 1959).

A las parturientas se les infiltró clorhidrato de lidocaína al 0,7 % desde la base del esternón hasta el borde anterior del pubis y a ambos lados de la línea media, donde se realizó una incisión amplia para exteriorizar el útero, ligando este por delante del cuello uterino y por los extremos de los dos cuernos y una vez extirpado el útero, fue sumergido en una solución al 2 % de yodo activo por 10 segundos y se pasó al interior del aislador a través de la trampa germicida que contenía Cloramina T al 4 % a una temperatura de 37 °C. Los neonatos fueron liberados de las membranas fetales procediéndose a cortar el cordón umbilical dejando un remanente de un centímetro aproximadamente. Los animales secados y reanimados se colocaron en cajas frente a lámparas infrarrojas a una temperatura que oscilaba entre 25 y 27 °C dentro del aislador, evitando la humedad de sus lechos. Desde que se ligaron los extremos del órgano grávido hasta que los animales se reanimaron, el tiempo no excedió de los 2,5 minutos (Phillips *et al.*, 1959; Landy *et al.*, 1960).

Las hembras histerectomizadas no sobrevivieron, la eutanasia fue practicada inmediatamente después de extraído el útero grávido administrándole CO<sub>2</sub> a una concentración 70 % por vía inhalatoria.

### **Alojamiento, limpieza y esterilización de los aisladores**

Los aisladores utilizados fueron fabricados por la Calhène (Francia), modelo LCI-RI-3, con folia flexible compuesta por cloruro de polivinilo (PVC) de tamaño estándar (volumen interior de 0.73 m<sup>3</sup>) de presión positiva y esterilizados por ácido peracético al 2 % conteniendo 0,1 % de detergente con alkyl aryl sulfonato como principio activo.

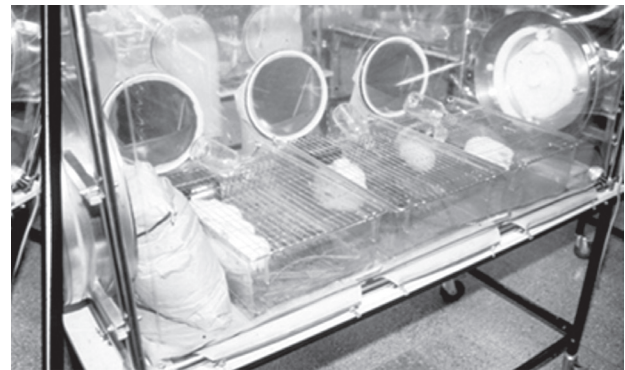
Los aisladores contaban con filtros de alta eficiencia, mangas con guantes de neopreno y dos sistemas de transferencia rápida con doble puerta para ser utilizados como aislador de transporte y/o transferencia. El aislador de cría presentaba un sistema de transferencia de doble puerta y otra puerta cerrada con una capota de PVC (figura 1).

### **Dietas, régimen de alimentación y esterilización de las dietas**

La dieta aplicada responde a una fórmula modificada (tabla 1) a partir de la L-477 en forma de papilla y por la C-484 sólida granulada (tablas 2 y 3) (Phillips *et al.*, 1959; Dieters *et al.*, 1976). La suplementación de Vitamina C y B1 así como el régimen de alimentación fueron transferidos de las experiencias de otros trabajos (tabla 4) y la cantidad de agua por 100 gramos de dieta seca varió acorde a la edad del animal (Phillips *et al.*, 1959; Dieters *et al.*, 1976).

El alimento (L-477 modificada) semisólido en forma de papilla se le ofreció a los animales a partir de las dos horas de nacidos, dos veces al día, a razón de 10 g/animal/día, fortificado con suplemento vitamínico en placas petri. En el momento de elaborar la papilla se adicionó 1 ml de suplemento vitamínico/animal. Al tercer día se fue eliminando el contenido de agua de la papilla y al séptimo día se les colocó en la jaula una pequeña cantidad de dieta sólida granulada (C-484). A partir de los 10 días, la dieta semisólida se limitó a una vez por día, reduciéndose gradualmente a expensas de un aumento en el consumo de la dieta granulada, y a los 21 días solo consumieron alimento sólido, agua a voluntad y el suplemento vitamínico a razón de 1 ml/animal/día. En ocasiones fue necesario enseñar a los animales a consumir la papilla de forma tal que reconocieran el alimento ofrecido.

Se prepararon tres formulaciones de suplemento vitamínico de acuerdo a las variaciones en los requerimientos de la especie durante los primeros 21 días de vida (tabla 4).



**Figura 1.** Curieles Dukin-Hartley SPF en aisladores con folia flexible de PVC.

**Tabla 1.** Fórmula de la papilla L-477 modificada.

Ingredientes	Cantidad (g)
Fórmula peletizada	100
Avena molida	100
Glucosa D (+) anhidra	10
Levadura Torula	15
Cloruro de Sodio	5
Agua	1000

**Tabla 2.** Fórmula peletizada C-484.

Materias primas	% de Inclusión
Trigo	30
Maíz	13
Avena	10
Soya	18
Alfalfa deshidratada	18,65
Aceite de girasol	2,0
Harina de pescado	2,0
CaCO <sub>3</sub>	1,1
CaHPO <sub>4</sub>	0,4
Mg(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,95
CH <sub>3</sub> COOK	0,9
Pre-mezcla minero-vitamínica	3,0

La dieta comenzó a esterilizarse por autoclave (Sakura, Japón) utilizando vacío a una temperatura de 121 °C/20 minutos, solamente los primeros 80 días del experimento. La suplementación con forraje o heno se experimentó con la primera generación a los 6 meses de edad, esta se sometió a vapor húmedo a igual temperatura pero por 30 minutos. La segunda generación lo recibió desde el nacimiento.

**Tabla 3.** Valor nutricional de la fórmula C-484.

Parámetros bromatológicos	%
Materia seca	90
Humedad	10
Proteína bruta	18,10
Fibra bruta	8,29
Grasa bruta	3,19
Energía metabolizable	2,40 Kcal/g
Ca	1,0
P	0,48

Las bolsas de alimento (C-484) se empaquetaron herméticamente con tres sacos de polietileno y se irradiaron con  $^{60}\text{Co}$  a una dosis de 1,5Mrad. El agua fue esterilizada por vapor húmedo a 121 °C/1h. La gasa, el encamado, las cajas de policarbonato con piso de rejilla, el equipamiento quirúrgico y los utensilios de cristal se pasaron a través de un cilindro metálico al aislador, después de ser sometidos a una temperatura de 121 °C/30 minutos en la autoclave.

#### Implantación de la microbiota gastrointestinal

La microbiota gastrointestinal se le administró por vía oral a los neonatos obtenidos por cesárea aséptica directamente en el estómago, usando una cánula rígida a las 24 y 48 horas del nacimiento. El ámpula contenía 0,5ml de una dilución en agua destilada de  $10^6/\text{g}$  de contenido de la porción final del íleon, ciego y principio del colon de curieles Dunkin-Hartley convencionalizados, monitoreados contra patógenos específicos.

#### Control microbiológico, necropsia y procesamiento histológico

Se monitoreó la esterilidad de los aisladores, el alimento, el agua, la placenta de cada animal reanimado, muestras de heces fecales frescas y los fómites. Se utilizó caldo Tioglicolato, caldo Triptona Soya y caldo Sabaraud incubándose aeróbicamente a temperatura de 55, 37 y 25 °C respectivamente. La necropsia de los animales recientemente muertos o moribundos se realizó en condiciones asépticas y se controlaron microbiológicamente sus heces, fragmentos de intestino, tráquea, pulmones y algún otro órgano con lesiones. Los segmentos del tracto gastrointestinal y los pulmo-

nes fueron fijados en formol neutro al 10 % y después embebidos en parafina, cortados a 4 $\mu$  y teñidos por hematoxilina y eosina. Los ciegos fueron pesados llenos empleando una balanza (Sartorius, Japón).

Los animales fueron muestreados para patógenos específicos como, *Salmonella* sp., *Pasteurella* sp., *Streptococcus* del grupo A y C, *Bordetella bronchiseptica*, *Toxoplasma gondii*, Virus Sendai, y parásitos internos y externos de acuerdo a lo planteado por Riera (2008) con el propósito de establecer las categorías microbiológicas de salud en los animales de laboratorio clasificadas en Libres de Gérmenes Patógenos Específicos (SPF) y convencionales.

#### Resultados

Se realizaron 26 histerectomías, cinco de ellas fueron extraídas del aislador por contener en el útero más de tres crías que no respiraron espontáneamente, obteniéndose 51 neonatos. La mortalidad más alta se registró entre los primeros 10 días de edad (58,8 %). Se lograron 12 animales adultos: nueve hembras y tres machos; de las hembras solo seis se reprodujeron aproximadamente a los nueve meses de edad.

De los 30 animales muertos durante los 10 primeros días de vida, el 83,3 % de ellos oscilaban entre los 45 y 65 g de peso al nacimiento, 6 animales murieron en las primeras 24 horas de vida con los pesos más bajos y el resto entre los 2 y 10 días de edad. Estos animales se mostraron anoréxicos, somnolientos, con pelo hirsuto y sucio, mientras se mantenían lo más cerca posible de la fuente de calor, desarrollaron un proceso disneico progresivo y muerte dentro de las 24 horas siguientes. Se detectaron trastornos nerviosos (convulsiones, tortícolis, movimientos desordenados de la cabeza y vueltas en círculo) a los cuales no sobrevivieron.

Los animales obtenidos por cesárea manifestaron en alguna oportunidad, enteritis leve con cambios poco sustanciales en la textura de sus heces, enteritis severas con deshidratación, pérdidas de peso, hasta diarreas con estrías sanguinolentas. Las necropsias mostraron neumonías causadas por bronco aspiración y neumonías donde se aisló *Staphylococcus aureus* no hemolítico, así como enteritis, colitis y tiflitis con aparición de francos procesos diarreicos sin aislamiento.

A medida que se introducía la dieta sólida, C-484, se detectaron distensiones cecales que conllevaron a la aparición de prolapsos rectales, así como cuatro obstrucciones intestinales y una de ellas concomitan-

**Tabla 4.** Suplementos vitamínicos.

Ingredientes	1 <sup>ra</sup> Semana de vida	2 <sup>da</sup> Semana de vida	3 <sup>ra</sup> Semana de vida
Ácido ascórbico (mg)	12,5	16,5	20
Tiamina (g)	0,05	0,05	0,05
H <sub>2</sub> O destilada (ml)	100	100	100



do con queratoconjuntivitis. Esta patología ocular no pudo ser enmarcada en ningún período específico y fueron diagnosticados ocho casos. Al analizar las secreciones oculares se aislaron *Pseudomonas* sp. y *Staphylococcus aureus* no hemolítico.

En algunos curieles jóvenes adultos se observó deformaciones de las extremidades posteriores o anteriores, tortícolis, pelaje no uniforme, bajo peso corporal, trastornos gastrointestinales con heces blandas hasta francas diarreas con prolapso rectal. De estos, los que no murieron, fueron apareados. Los que murieron, padecieron deshidratación y pérdida de peso extrema a consecuencia de una disminución del consumo de alimento y una ingestión exagerada de agua que conllevó a la distensión cecal con paredes muy finas, que mostraron acortamiento de las vellosidades, degeneración del epitelio de absorción e infiltrado inflamatorio escaso a predominio de neutrófilos, junto a un contenido muy líquido de coloración normal. Cuando comenzamos a irradiar las dietas el aspecto físico de los animales fue mejorando sustancialmente y el período de vida se fue alargando. Además se redujo el tamaño cecal en machos de 45 % a 13 % y en hembras de 31 % a 15 % con relación al peso corporal.

Tres animales sufrieron fracturas completas de los huesos de una o dos de sus extremidades al accidentarse con el piso de rejilla de la caja.

Con los 12 animales obtenidos por cesárea aséptica se conformaron dentro del aislador de cría dos grupos de cuatro hembras por un macho, seis se gestaron, dos abortaron y otra murió a causa de parto distócico. De la primera gestación nacieron cinco crías, todas hembras. Las hembras que abortaron lograron seis crías en el segundo parto, tres hembras y tres machos. Es decir, nacieron por parto natural en condiciones controladas un total de 11 animales, ocho hembras y tres machos.

Los 11 animales nacidos por parto natural y lactados por sus madres tuvieron un comportamiento muy superior a los animales obtenidos por histerectomía. La ganancia en peso y la talla alcanzada fue superada, el pelaje fue uniforme, limpio, brillante y no practicaron la tricofagia. No se observaron deformidades de las extremidades, procesos diséicos, digestivos ni nerviosos.

En los controles microbiológicos se aislaron intermitentemente *Staphylococcus aureus* no hemolítico, Bacilos esporulantes y *Pseudomonas* sp. y no se reportaron hongos ni parásitos.

Se lograron curieles obtenidos por cesárea aséptica, mantenidos en aisladores con dietas estériles, capaces de reproducirse por primera vez en el país, libres de patógenos específicos: *Salmonella* sp., *Pasteurella* sp., *Streptococcus* del grupo A y C, *Bordetella bronchiseptica*, *Toxoplasma gondii*, *Virus Sendai*, y parásitos internos y externos.

## Discusión

Indudablemente el período más peligroso de la vida es el neonatal. En ninguna otra ocasión se enfrentará el individuo a desafíos más impresionantes que la transición de la existencia intrauterina dependiente, a la vida post natal independiente. Si este tránsito ocurre utilizando el método de la cesárea, el individuo estará expuesto a un estrés superior y a mayores riesgos (Shofield y Cotran 2007). El período desde la aplicación de la anestesia hasta la reanimación de los curieles (neonatos) se consideró un punto crítico si se compara con la prolongada sobrevivencia en las ratas según Francis et al. (2001) y los conejos citado por Forte et al. (2001) después de la dislocación cervical de las madres histerectomizadas, por eso se le prestó mucho interés al tiempo que no excediera de 2,5 minutos, desde la ligadura del útero grávido hasta su reanimación (Landy et al., 1960).

La alta letalidad en los diez primeros días de vida pudo deberse a la incorrecta selección de animales, considerados prematuros por otros autores, que arrojaron índices superiores de sobrevivencia al emplear neonatos de 70 g o más (Dieters et al., 1976).

Los microorganismos oportunistas aislados, los relacionamos con defectos en la implantación de la microbiota gastrointestinal. Otras investigaciones demostraron que el desbalance de la microbiota cecal en curieles obtenidos por histerectomía y mantenidos en barrera causó alta mortalidad, infecciones por microorganismos oportunistas, prevaleciendo los trastornos entéricos con cambios histológicos semejantes a los descritos en nuestros resultados, además de neumonías, otitis media y reducción del peso corporal e indicaron que los problemas pudieron deberse a una pobre o inadecuada composición de la microbiota intestinal, constituida mayormente en los curieles por organismos bacteroidaceae y peptococaceae (Yanabe et al., 2001). Estudios en conejos indicaron que la inoculación de una microbiota completa autóctona es un método apropiado para convertir un animal GF a su estado normal. La microbiota completa autóctona ayuda al establecimiento de la resistencia de especies patógenas y patógenas oportunistas, además manifestó ser esencial para la salud y la sobrevivencia de los animales obtenidos por histerectomía (Yanabe et al., 1999).

Los desajustes dietéticos conjuntamente con una mala implantación de la microbiota gastrointestinal influyeron en la salud de los curieles obtenidos por cesárea y aunque no fue demostrado, la microbiota implantada se multiplicó, los microorganismos ocuparon su nicho correspondiente y el heno o hierba estéril los proveyó de algún factor fundamental del crecimiento y de un sustrato adecuado para la proliferación bacteriana, inferido por la mejoría de su apariencia clínica.

Otros autores dieron a conocer los desajustes en la dieta sobre la composición de la microbiota y plantearon que la utilización competitiva de escasos nu-

trientes por los microorganismos autóctonos y sus hospederos pueden repercutir sobre los procesos fisiológicos y bioquímicos del animal, llegando a complicar la estimación cuantitativa de los requerimientos dietéticos (Gordon y Pesti 1971). Estas valoraciones nos ayudaron a comprender el comportamiento superior de los animales amamantados por sus madres.

La dieta es un factor fundamental y de gran importancia para la investigación gnotobiótica. No solo el cambio cualitativo de las dietas influye sobre el fisiologismo animal, simplemente el modo de esterilización y la forma de presentación inducen a grandes variaciones fisiológicas (Rote y Blaut 2013). Nosotros comprobamos la influencia de estos cambios cuando se comenzó a irradiar las dietas y con la aparición de trastornos gastrointestinales a medida que se sustituía la dieta de forma escalonada de semisólida a sólida peletizada. Desde el punto de vista de la estabilidad de los nutrientes, Coates (1984) demostró que la irradiación es el método de preferencia para la esterilización de las dietas por ser menos destructivos sus efectos sobre las proteínas y aminoácidos en dosis tan altas como la de 10Mrad.

Muchos son los factores que influyen en el establecimiento de la microbiota gastrointestinal (Wagner 2008; Fava y Danese 2011). Se llegará a la "Normalización" si se reúnen una gran variedad de microorganismos y factores como la composición de la dieta, la reducción del tamaño cecal y la estructura histológica del sistema gastrointestinal en los animales gnotobióticos (Tlaskalová-Hogenová et al., 2011). Y, el establecimiento de la microbiota gastrointestinal será semejante al del animal convencional según Gordon y Pesti (1971), solo cuando sean coleccionadas grandes cantidades de microorganismos de heces y de contenido intestinal de un animal convencional sano, sin la intervención de medios de cultivos.

## Conclusiones

La metodología aplicada permitió obtener curieles criados en aisladores, derivados por histerectomía aséptica y alimentados con dietas estériles, con un comportamiento estable y superior en la segunda generación que mostró ser fértil, resultado de la interacción entre los factores hospederos-microbiota-dieta. La especialización del personal y la experiencia acumulada nos prepararon para incursionar en otras especies como ratas, ratones, aves, conejos, ovinos y perros. Los animales asociados con una microbiota gastrointestinal autóctona fueron libres para todos los patógenos muestreados.

## Referencias bibliográficas

Coates ME. 1984. Diets for Germ-Free animals Part 1. Sterilization of diets. In *The Germ-Free animal in biomedical research. Laboratory Animal Handbooks* 9. Chap 3. Edited by ME. Coates and BE. Gustafsson, London, p 85-90.

Dieters K, Renner S, Kruger E and Appel KR. 1976. Some data on establishing a SPF guinea pig colony. *Lab. Anim. Science*. 26:288.

Fava F and Danese S. 2011. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe? *World J Gastroenterol*. 17(5):557-66.

Festing MFW. 2010. The desing of animal experiments. In *The UFAW Handbook on the care and management of laboratory animals*. Chap 3. 7<sup>ta</sup> Edition, p 23-36.

Forte MC, Francis TL, González NB, Arteaga PME, Alonso MA. 2001. Obtención y mantenimiento de conejos libres de patógenos específicos en Cuba. *Rev. Animales de Experimentación. La Revista Hispanoamericana*. 6(1):17-19.

Francis TL, Forte MC, Alonso MA, González NB, Arteaga PME. Remigio CA. 2001. Primeras partidas de ratas gnotobióticas en Cuba. *Rev. Animales de Experimentación. La Revista Hispanoamericana*. 6(1):5-6.

Gordon HA and Pesti L. 1971. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relations helps. *Bacteriological Reviews*. 35(4):390-429.

Landy JJ, Yerasimides TG, Growdon JH and Bausor SC. 1960. Germfree guinea pig delively by hysterectomy. *Surg. Forum*. 11:425-426.

Martínez PS. 2008. Revolución cubana: hechos más que palabras. En *Un país de hombres y mujeres de ciencia*. Editorial José Martí. Ciudad de La Habana. Cuba, p 77.

Molinete MC, Forte C, Fernández J, Francis L y Ferrera S. 1988. Aplicación de la gnotobiosis en aves de la raza White Leghon. *Revista Cubana de Ciencias Avícola*. 15(1):1-14.

Nuttall GHF and Thierfelder H. 1895. Thierisches Leben ohne Bakterien in Verdauungskanal. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem*. 21:109-121.

Nuttall GHF and Thierfelder H. 1896. Thierisches Leben ohne Bakterien in Verdauungskanal. II. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem*. 22:62-73.

Nuttall GHF and Thierfelder H. 1897. Thierisches Leben ohne Bakterien in Verdauungskanal. III. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem*. 23:231-235.

Phillips BP, Wolfe PA. and Gordon HA. 1959. Studies on rearing the guinea pigs germ-free. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 78:183-207.

Riera L, Lugo S, Sosa I, Entrena A, Acevedo MC, Tabares T, Llanes H, Fernández N, Joglar I, Otaño A, Zamora Z, Negrín N, González A, Rodríguez K, Muñoz E, Crespo E, Peña M, Chala T. 2008. Programas de aseguramiento de la Calidad en la producción de animales de laboratorio. *Rev. Salud Animal*. 30(1):12-16.

Rothe M and Blaut M. 2013. Evolution of the gut microbiota and the influence of diet. *Benef Microbes*. 4(1):31-37.

Shofield D y Cotran RS. 2007. Enfermedades durante la lactancia y la niñez. En *Robbins, Patología estructural y funcional*. Cap 11. 6<sup>ta</sup> Edición. Editora Mc Graw-Hill. Interamericana, p 486-518.

Tlaskalová-Hogenová H, Stěpánková R, Kozáková H, Hudcovic T, Vannucci L, Tučková L, Rossmann P, Hrnčář T, Kverka M, Zákostelská Z, Klimešová K, Příbylová J, Bártová J, Sanchez D, Fundová P, Borovská D, Srůtková D, Zidek Z, Schwarzer M, Drastich P, Funda DP. 2011. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol*. 8(2):110-120.

Wagner JE and Foster HL. 1976. The biology of the guinea pig. Chapter 4. Ed. Joseph ER. Wagner and Patrick J. Manning, Academic Press, New York, p 21-30.

Wagner RD. 2008. Effects of microbiota on GI health: gnotobiotic research. *Adv Exp Med Biol*. 635:41-56.

Yanabe M, Shibuya M, Gonda T, Asai H, Tanaka T, Narita T, Sudou K, Matsui T, Itoh K. 1999. Production of ex-germfree rabbits for establishment of specific pathogen-free colonies. *Exp. Anim*. 48(2):79-86.

Yanabe M, Shibuya M, Gonda T, Asai H, Tanaka T, Sudou K, Narita T, Matsui T, Itoh K. 2001. Establishment of specific pathogen-free guinea pig colonies using limited flora guinea-pig associated with conventional guinea-pig flora, and monitoring of their cecal flora. *Exp Anim*. 50(2):105-113.

# Nueva metodología para la formulación de la vacuna Heberpenta-L

## New methodology for the formulation of the vaccine Heberpenta-L

Imeray Díaz\*, Maikel Villegas\*\*, Luis Carlos Hidalgo\*\*\*

### Resumen

La vacuna Heberpenta-L, está indicada para la inmunización activa contra la difteria, tétanos, tos ferina (pertussis), hepatitis B y *Haemophilus influenzae* tipo b. En el Centro Nacional de Biopreparados se diseñó una nueva planta de producción de productos parenterales, resultando la vacuna pentavalente uno de los productos recién introducidos. Con tal propósito se diseñó una nueva metodología para la formulación de la vacuna, adecuando los procedimientos normalizativos de operación vigentes a esta nueva instalación. La validación con medio de cultivo caldo triptona soya, resultó una de las etapas más importantes para garantizar, tanto las operaciones de esterilización y enfriamiento de las soluciones, como todos los pasos críticos en la formulación y operaciones asépticas para futuros productos. Se estableció una nueva metodología en el proceso de formulación para la preparación de las soluciones, la cual tuvo lugar en un área independiente al área de la formulación final del producto. Los resultados satisfactorios obtenidos en la formulación de tres lotes de consistencia de la vacuna Heberpenta-L, no solo garantizaron el cumplimiento de los requisitos de calidad establecidos para esta vacuna, sino que además constituyeron la base preliminar a largas campañas de otros productos.

**Palabras clave:** vacuna pentavalente, parenterales, producción.

### Abstract

The vaccine Heberpenta-L, is suitable for the active immunization against the diphtheria, tetanus, ferocious cough (pertussis), hepatitis B and *Haemophilus influenzae* type b. In the National Center of Bioproducts a new plant of production of products parenterals was designed, being the vaccine pentavalent one of the recently introduced products. With such a purpose a new methodology was designed for the formulation of the vaccine, adapting the procedures effective operation normalizative to this new installation. The validation with culture medium broth triptone soy was one of the most important stages to guarantee, so much the sterilization operations and cooling of the solutions, as all the critical steps in the formulation and aseptic operations for future products. A new methodology settled down in the formulation process for the preparation of the solutions, which took place in an independent locate to the locate of the final formulation of the product. The satisfactory results obtained in the formulation of three batch of consistency of the vaccine Heberpenta-L, they guaranteed the execution of the established requirements of quality for this vaccine and constituted the preliminary base to long campaigns of other products.

**Key words:** pentavalent vaccine, parenteral, production.

**Recibido:** agosto 26 de 2013

**Aprobado:** mayo 5 de 2014

### Introducción

El desarrollo de la biotecnología en Cuba ha evolucionado en los últimos años de manera vertiginosa; nuevos productos con grandes potenciales han ido culminando su etapa de desarrollo para llegar a ser productos comercializables con posibilidades de convertirse en productos líderes del mercado local. Dentro de este grupo se encuentran: la vacuna Heber-

biovac HB, Heberprot-P, Interferón alfa, vacuna bivalente HB-Hib, vacuna Quimi-Hib, Trivac-HB, la vacuna Heberpenta-Líquida, entre otros.

La Heberpenta-L es una vacuna pentavalente líquida que inmuniza contra la difteria, el tétanos, la tosferina, la hepatitis B y la bacteria *Haemophilus influenzae* tipo b, que provoca enfermedades como la meningitis, neumonías y la otitis en niños (Pérez, 2004). Es un lí-

\* Licenciada en Ciencias Farmacéuticas.

\*\* Licenciado en Biología.

\*\*\* Ingeniero Químico Centro Nacional de Biopreparados. Carretera a Beltrán Km 1 ½. Bejucal, Mayabeque. Cuba. imeray.diaz@biocen.cu, villegas@biocen.cu, lchidalgo@biocen.cu

quido grisáceo, libre de partículas que al estar en reposo se separa en dos fases: un sedimento blanco y un sobrenadante transparente que al agitarse se resuspende fácilmente. Es un inyectable para administración intramuscular que clasifica como parenteral de bajo volumen (BioCen, 2003).

La vacuna Heberpenta-L se produce actualmente en la Planta de Productos Parenterales 2 (PPP2) del Centro Nacional de Biopreparados (BioCen), centro que constituye la rama productiva de la mayoría de los productos desarrollados en Cuba. Debido al incremento en las exigencias de las normas de operación y control, declaradas por las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) de productos biofarmacéuticos y el aumento de la exportación de productos biotecnológicos cubanos; se diseñó una nueva Planta de Producción de Parenterales (PPP3), con mejores condiciones de diseño, instalación y tecnología, que la existente PPP2.

La formulación de la vacuna Heberpenta-L, es actualmente la más compleja y crítica que se ejecuta en el área de producción, debido a la cantidad de Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFA) que la componen y a las diferentes etapas durante el proceso, que a su vez, son semejantes a las de futuros productos. Esto justificó el hecho de formular la vacuna pentavalente para validar el proceso de formulación y realizar los lotes de consistencia en la nueva planta; por tal motivo, el objetivo de este trabajo consistió en diseñar una nueva metodología para la formulación de la vacuna, que cumpliera con todos los requisitos establecidos en las BPF de productos estériles.

## Materiales y métodos

La formulación de la vacuna Heberpenta-L fue el primer proceso ejecutado en la nueva PPP3, por lo que se realizó la validación de la misma en el período del 2 al 7 de octubre del 2011, mediante una prueba de simulación del proceso con medio de cultivo caldo triptona soya (CTS). El CTS es un medio establecido para la ejecución de validaciones de procesos, pues su composición permite el crecimiento de una amplia gama de bacterias, incluyendo las más exigentes.

Se realizaron tres réplicas simulando la formulación de la vacuna pentavalente en bolsas plásticas de 100 L. Se simularon cada una de las etapas del proceso de formulación, separando un resto de medio de cultivo en cada botellón empleado; los cuales se incubaron 15 días a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , y al cabo de este tiempo, se tomaron 25 bulbos estériles, para realizar ensayo de promoción de crecimiento (BioCen, 2011).

La formulación de la vacuna pentavalente, es más compleja que la del resto de los productos formulados en BioCen debido al número y diversidad de antígenos presentes en la misma. El gráfico 1 muestra de manera general el método de formulación en forma de diagrama de bloques.

**Tabla 1.** Composición de la vacuna pentavalente

Componente
Proteína antigénica de superficie del VHB (Antig. HB)
Anatoxina diftérica (Antig. TD)
Anatoxina tetánica (Antig. TT)
Células enteras muertas de <i>Bordetella pertussis</i> (Antig. P)
<i>Haemophilus influenzae</i> tipo B (Antig. Hib)
Hidróxido de Aluminio ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ )
Fosfato de Aluminio ( $\text{AlPO}_4$ )
Cloruro de Sodio ( $\text{NaCl}$ )
Hidrogenofosfato de disodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
Dihidrogenofosfato de sodio dihidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
Tiomersal
Agua para inyección

La nueva metodología para la formulación de la vacuna Heberpenta-L en la PPP3, consistió en que las soluciones preparadas y esterilizadas (solución gel de hidróxido de aluminio, solución fosfato de aluminio, solución tampón de fosfatos) en un área grado C, fueron transferidas por un pase a pared (lazo con conexión estéril) hacia el área de formulación, terminando bajo el flujo laminar (área grado A) (BioCen, 2012; BioCen 2013).

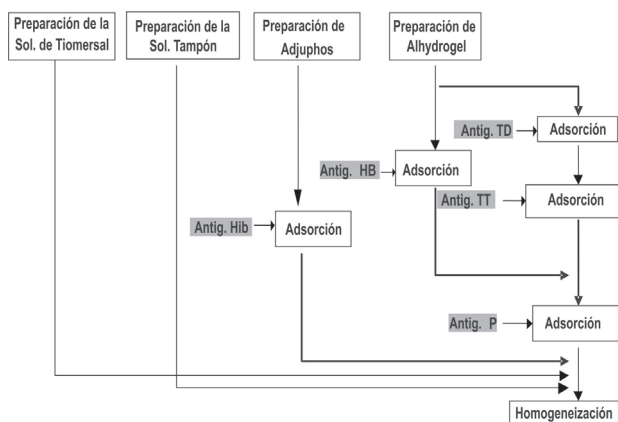
La existencia de un área para preparar soluciones y otra para formular la vacuna, brindó una mayor seguridad al producto, debido a que los reactivos que conforman las soluciones no están en contacto con los componentes estériles de la formulación. De esta manera se elimina el riesgo de contaminación cruzada, garantizando mejoras al procesamiento aséptico y una mayor garantía y facilidad durante las diferentes operaciones asépticas del proceso de formulación.

**Tabla 2.** Resumen de los lotes formulados

Producto	Lote	Fecha	Rendimiento (%)
Heberpenta-L	1	14/12/2011	95-99
Heberpenta-L	2	16/12/2011	95-99
Heberpenta-L	3	21/12/2011	95-99

Cada solución se preparó independientemente en un reactor (tanque de acero inoxidable de 150L de capacidad) y se transfirió a botellón o bolsa, bajo flujo laminar en el área de formulación, donde se llevaron a cabo las adiciones y adsorciones de los Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFA): Antig. TD, Antig. TT, Antig. HB, Antig. P, Antig. Hib. Se mantuvieron las condiciones de agitación de la bolsa (bolsa agitada de 100L) para homogeneizar todos los componentes (BioCen, 2012; BioCen, 2013).





**Gráfico 1.** Esquema general de formulación de la vacuna pentavalente

## Resultados y discusión

Se verificó la esterilidad del formulado y de los botellones utilizados en la simulación de la formulación, en la tabla 3 se aprecia que en las muestras no se observó crecimiento microbiano. Los resultados demuestran que las operaciones críticas del proceso de formulación tales como, simulaciones de las transferencias, adsorciones y adiciones de los IFA; arrojaron resultados satisfactorios conllevando al cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Estériles (BPF).

Los resultados obtenidos en las muestras tomadas después de los 15 días de incubación y que se exponen en la tabla 4, demuestran que el medio de cultivo utilizado en las pruebas promueve el crecimiento de los controles microbiológicos utilizados, *Bacillus subtilus* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus niger* ATCC 19404, lo cual confirmó que el medio de cultivo empleado en todas las operaciones de formulación presentó la funcionalidad biológica para el desarrollo microbiano.

A continuación, se muestran los resultados de los lotes obtenidos en los ensayos realizados por los laboratorios de Control de la Calidad.

Los resultados referentes a la esterilidad de la vacuna respondieron a los requisitos establecidos en las especificaciones para la misma, al no detectarse presencia de microorganismo durante la realización del ensayo, criterio esencial para los productos parenterales.

Las características organolépticas de la vacuna cumplieron con lo establecido en las especificaciones. Visualmente se detectaron las características y la coloración típica de la vacuna, durante la adición de los componentes. Los resultados demuestran que las etapas de formulación fueron ejecutadas correctamente.

Los valores alcanzados en la concentración de tiomersal, ión aluminio y pH se encontraron en los rangos establecidos para el producto. En el caso del tiomer-

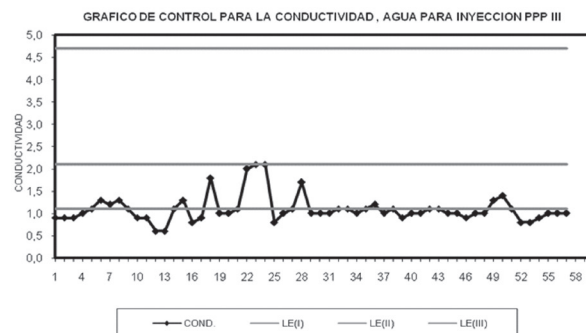
sal (preservante de la formulación) la concentración reportada en los resultados, al encontrarse dentro del rango de aceptación, influye favorablemente en la calidad del producto, previniendo el crecimiento microbiano en la vacuna durante su almacenamiento y uso, así como en la esterilidad durante el llenado en las líneas de producción. Los resultados reflejados para la concentración de ion aluminio garantizaron que las soluciones preparadas de hidróxido y fosfato de aluminio permitieran la completa adsorción de los IFA, obteniéndose valores de potencia y toxicidad dentro de los rangos de aceptación. La preparación exacta de la solución tampón de fosfatos permitió la obtención de una vacuna con valores de pH dentro de los límites de especificación, favoreciendo a su vez la actividad biológica de los IFA empleados.

Los resultados analíticos obtenidos en la validación y formulación de los tres lotes de consistencia, demostraron que la nueva metodología fue válida y correcta para formular la vacuna Heberpenta-L. Además, permitieron la introducción de lotes de varios productos en la nueva planta.

Se analizaron los resultados de los suministros de apoyo crítico a la producción, utilizados en los procesos de formulación durante el período en que se fabricaron los lotes de consistencia de Heberpenta-L. A través de estas figuras se puede apreciar que el agua para inyección (API) utilizada, se encontraba conforme para iniciar la preparación de las soluciones y con ello la formulación.

En la figura 1, se muestran los valores de conductividad de los puntos muestreados en el período en que se formularon los lotes 1, 2 y 3, los cuales cumplían con el intervalo reportado en las especificaciones (1,1- 4,7  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) (USP 35-NF-30, 2012). Los resultados tuvieron un impacto significativo en la pureza química del agua y en su aptitud para usarla en el proceso de formulación.

El carbono orgánico total es una medida indirecta de las moléculas orgánicas presentes en las aguas para uso farmacéutico, determinadas como carbono. Los valores de carbono orgánico resultaron conformes, demostrando la calidad del API empleada en el proceso. (figura 2)



**Figura 1:** Resultados de conductividad del API

**Tabla 3.** Verificación de la esterilidad en las muestras tomadas a partir del formulado y botellones incubados.

Lote	Código de la muestra	Verificación de la esterilidad
MCF (02/10/11)	MCF (02/10/11)- Antig. TD	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. TT	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. P	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. HB	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. Hib	Conforme
	MCF (02/10/11)- Sol. Tiomersal	Conforme
	MCF (02/10/11)- Alydrogel	Conforme
	MCF (02/10/11)- Adjuphos	Conforme
	MCF (02/10/11)- Sol. Tampón	Conforme
MCF (03/10/11)	MCF (02/10/11)- Antig. TD	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. TT	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. P	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. HB	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. Hib	Conforme
	MCF (02/10/11)- Sol. Tiomersal	Conforme
	MCF (02/10/11)- Alydrogel	Conforme
	MCF (02/10/11)- Adjuphos	Conforme
	MCF (02/10/11)- Sol. Tampón	Conforme
MCF (06/10/11)	MCF (02/10/11)- Antig. TD	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. TT	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. P	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. HB	Conforme
	MCF (02/10/11)- Antig. Hib	Conforme
	MCF (02/10/11)- Sol. Tiomersal	Conforme
	MCF (02/10/11)- Alydrogel	Conforme
	MCF (02/10/11)- Adjuphos	Conforme
	MCF (02/10/11)- Sol. Tampón	Conforme

**Tabla 4.** Resultados de la prueba de promoción de crecimiento en los lotes formulados.

Lote	Muestra	Resultados
MCF (02/10/11)	25 bulbos estériles	Conforme
MCF (03/10/11)	25 bulbos estériles	Conforme
MCF (06/10/11)	25 bulbos estériles	Conforme

Los valores de la cuantificación de endotoxinas bacterianas gramnegativas en el API, usando un lisado de amebocitos del cangrejo herradura (*Limulus spp.*), concluyeron conforme de acuerdo a la figura 3, al encontrarse inferior al valor permisible para la prueba (0,25 UE/mL). Del mismo modo respondieron a las especificaciones de la vacuna, los datos relacionados con los conteos totales de aerobios mesófilos (figura 4), con un crecimiento microbiano que no sobrepasó las 0,1 UFC/

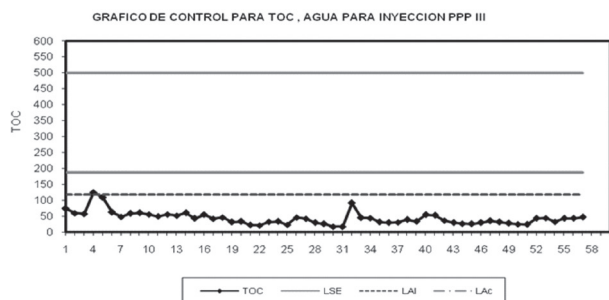
mL; ambas pruebas evidenciaron la calidad microbiológica del API utilizada (USP 35-NF-30, 2012).

### Conclusiones

Los resultados satisfactorios obtenidos en la validación de las etapas del proceso de formulación de la vacuna Heberpenta-L, posibilitaron la producción de tres lotes de consistencia.

**Tabla 5.** Resumen de los resultados analíticos obtenidos de lotes formulados

Ensayos	Resultados			Límite de aceptación
	1	2	3	
Esterilidad	Responde	Responde	Responde	Pasa la prueba
Características organolépticas	Responde	Responde	Responde	Responde
Contenido de tiomersal	Responde	Responde	Responde	Conforme
Contenido de Ion Aluminio	Responde	Responde	Responde	Conforme
pH	Responde	Responde	Responde	Conforme
Hib adsorbido (PRP)	Responde	Responde	Responde	Conforme
Potencia de anatoxina diftérica	Responde	Responde	Responde	Conforme
Potencia de anatoxina tetánica	Responde	Responde	Responde	Conforme
Potencia de Bordetella pertussis	Responde	Responde	Responde	Conforme
Toxicidad específica de la anatoxina diftérica y tetánica	Responde	Responde	Responde	Conforme
Toxicidad de Bordetella pertussis	Responde	Responde	Responde	Conforme



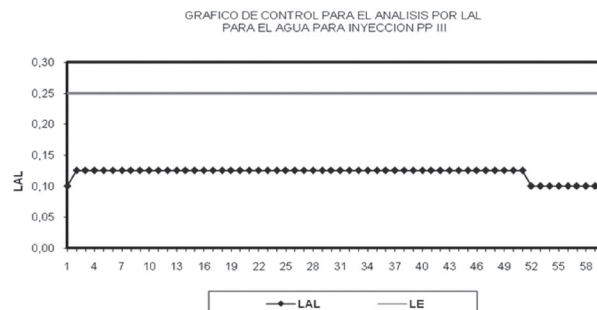
**Figura 2:** Resultados de TOC del API

Los resultados de los lotes 1, 2 y 3 formulados según la nueva metodología, se encontraron en los límites establecidos para el control de la calidad del producto, lo cual resultó propicio para la obtención de la licencia de fabricación de esta vacuna en PPP3.

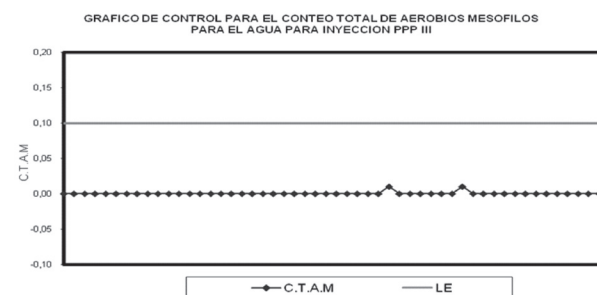
Los resultados obtenidos en la validación, así como, en la nueva metodología aplicada para la preparación de las soluciones y la formulación de la vacuna, conllevaron al desarrollo de la formulación de otros productos en la nueva planta.

## Referencias Bibliográficas

- BioCen. 2003. Expediente Maestro: DTP-HB+Hib-TT. Cód. EM.126. Edición 01. 3-7
- BioCen. 2013. Formulación de la vacuna Heberpenta-L en bolsas plásticas con sistema de agitación en la Planta de Productos Parenterales 3. PNO 05B.027. Edición 01. 3-8.
- BioCen. 2012. Preparación de las soluciones de la vacuna Heberpenta-L en la Planta de Productos Parenterales 3. PNO 05B.028. Edición 02. 3-9



**Figura 3:** Resultados de LAL del API



**Figura 4:** Resultados de CETAM del API

- BioCen. 2011. Protocolo para la validación de los procesos asepticos de formulación, llenado y liofilización en PPP 3. PRO 12.11.002.4. Edición 01. 4-8.
- Pérez Joel. 2004. Incremento de la capacidad de producción del sistema de formulación Steridose. Tesis de Maestría. Facultad de Ingeniería Química. ISPJAE. 26-48.
- USP 35-NF-30. 2012. Twenty Seventh Revisión. United Pharmacopoeial Convention, Inc. Rockville: Staff Liaison. 54-252.

# Actividad antibacteriana de soluciones ácidas de quitosano obtenido de exoesqueleto de camarón

## Antibacterial activity of chitosan acid solutions obtained from shrimp exoskeleton

Alexander Pérez Cordero\*, Johanna Rojas Sierra\*\*, Johana Rodriguez Ruiz\*\*\*

Irma Arrieta Álvarez\*\*\*\*, Yenis Arrieta Álvarez\*\*\*\*, Andrés Rodríguez Carrascal\*\*\*\*

### Resumen

El trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de soluciones ácidas de quitosano obtenido a partir del exoesqueleto de camarón, sobre siete bacterias patógenas, cinco de las cuales corresponden a patógenas de humanos (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* UDS, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella oxytoca* ATCC 43863 y *K. oxytoca* ATCC 43086) y las fitopatógenas (*Pectobacterium* sp UDS y *Burkholderia glumae* 320012-CIAT). Concentraciones de soluciones de quitosano de 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5 % (v/v) disueltas en ácido acético de 1.0, 1.5, 2.0 % (v/v) fueron preparadas; a partir de estas concentraciones, mediante la técnica de Kirby-Bauer se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro*. Los resultados de actividad antimicrobiana mostraron diferencias altamente significativas entre la especie de bacteria y los tratamientos de quitosano. Las bacterias *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. oxytoca* (ATCC 43086 y ATCC 43863) fueron las más susceptibles a los tratamientos, mientras que *E. faecalis*, *Pectobacterium* sp y *B. glumae* mostraron resistencia. Los tratamientos T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub>, T<sub>7</sub>, T<sub>8</sub>, T<sub>9</sub> en donde las concentraciones de quitosano estuvieron por encima a las del ácido acético, se presentaron mayores valores medios de actividad de antimicrobiana en mm y aumentó este valor para los tratamientos T<sub>9</sub> (5.8095 mm), T<sub>8</sub> (6.00 mm) para y T<sub>9</sub> (5.8095 mm), donde las concentraciones de quitosano de 2.5 y 3.5%, disueltas en ácido acético fueron igual a 2%. Los resultados de este estudio en el Caribe Colombiano permitirán a futuro el reaprovechamiento del exoesqueleto de camarón como fuente de quitosano como un compuesto potencial frente al manejo al problema de salud pública ocasionada por las enfermedades bacterianas.

**Palabras claves:** camarón, quitosano, bacterias, patógenas.

### Abstract

The work was to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of chitosan obtained from exoskeleton of shrimp, on seven pathogenic bacteria, five of which corresponded to human pathogenic strain (ATCC 29212 *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* UDS, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella oxytoca*, *K. oxytoca* ATCC 43863 and ATCC 43086) and two phytopathogenic strain (*Pectobacterium* sp UDS and *Burkholderia glumae* 320012-CIAT). Solution of chitosan of 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 and 3.5% (v/v) dissolved in 1.0, 1.5, 2.0% (v / v) acetic acid was prepared and from these is by diffusion through the Kirby-Bauer technique was evaluated for antibacterial activity *in vitro*. The results of the antimicrobial activity showed significant differences between the species of bacteria and chitosan treatments evaluated. *P. aeruginosa*, *E. coli* and *K. oxytoca* (ATCC 43086 and ATCC 43863) were the most susceptible to the treatments, while *E. faecalis*, *B. glumae* and *Pectobacterium* sp were resistant. The treatments T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub>, T<sub>7</sub>, T<sub>8</sub>, T<sub>9</sub>, where chitosan concentrations were above the acetic acid, showed higher mean mm antimicrobial activity and this value increased to T<sub>9</sub> treatments (5.8095 mm), T<sub>8</sub> (6.00 mm) and T<sub>9</sub> (5.8095 mm), where chitosan concentrations 2.5 and 3.5% solution in acetic acid was equal to 2%. The results of this study in the Colombian Caribbean enable future reuse of the exoskeleton of shrimp as a source of chitosan as a potential compound against handling the public health problem caused by bacterial diseases.

**Key words:** shrimp, chitosan, bacteria, pathogens.

**Recibido:** junio 20 de 2013

**Aprobado:** mayo 5 de 2014

\* Ingeniero Agrónomo, MSc y Ph.D en Microbiología, Universidad de Sucre, Grupo Bioprospección Agropecuaria. alexpcor@Unisucre.edu.co

\*\* Biología, MSc en Microbiología, Universidad de Sucre, Grupo Bioprospección Agropecuaria. rojas\_johanna@yahoo.com

\*\*\* Química Farmacéutica, MSc en Química, Universidad de Cartagena

\*\*\*\* Biólogos, Universidad de Sucre, grupo Bioprospección Agropecuarias. Universidad de Sucre Cra 28 #5-267, Teléfono: 282 1240 Sincelejo (Sucre), Colombia - Sur América.



## Introducción

A nivel mundial, diversas enfermedades afectan a poblaciones humanas, animales y vegetales; su control durante muchos años se ha dado mediante el uso de productos químicos, los cuales debido a su intensa utilización han generado problemas de contaminación en el medio ambiente, resistencia de patógenos, extinción de comunidades de microorganismo benéficos y problemas de salud en los humanos. Sustentado lo anterior, se hace necesario desarrollar alternativas biológicas de control, para mejorar así la calidad de vida de toda la población (Lárez et al., 2008).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que “El uso abusivo de los antibióticos es una de las principales causas del incremento de la resistencia bacteriana y uno de los mayores problemas de salud pública” (Queipo et al., 2000). La prescripción no adecuada y abusiva de los antibióticos, la prolongación de los planes más allá de lo necesario, la aplicación de dosis no óptimas, la irregularidad en la toma de las drogas, son los principales factores que han llevado a una alta tasa de resistencia microbiana (Álvarez, 2007).

De otra parte, los residuos industriales de productos acuícolas, se han convertido en un problema ambiental y de salud pública, por la producción de grandes cantidades de residuos orgánicos como son los exoesqueletos de camarones. Estos desechos contaminan al ambiente y además pueden afectar la salud de las comunidades aledañas en donde se vierten. El quitosano es biopolímero natural no tóxico derivado por desacetilación de la quitina, el principal componente del exoesqueleto de crustáceos e insectos. En los últimos años ha recibido considerable atención por la aplicación en los campos de la biomédica, alimento, ingeniería química, farmacéutica con excelentes propiedades antibacteriana (Fernandes et al., 2009) antifúngica y antiviral; nutrición y en la protección del ambiente y la agricultura (Li et al., 2008).

En la Región Caribe Colombiana existen alrededor de cuatro empresas camaroneras reconocidas, como son: Acuipisca y Colombiana de acuicultura en el área de Cartagena, seguida de Cartagena de Acuicultura, ubicada en el municipio de San Onofre (Sucre) y Agrosolidad, localizada en el estuario de la bahía de Cispata (San antero – Córdoba). Estas son una fuente de materia prima para la obtención de quitosano, sin embargo no ha sido aprovechada, así mismo en nuestra región no existen evidencias del efecto del quitosano sobre bacterias patógenas, convirtiéndose este subproducto en un material innovador y una nueva alternativa biológica para el control de enfermedades (Lárez et al., 2008).

En el presente estudio se realizó evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de soluciones ácidas de quitosano sobre bacterias patógenas en humanos tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* y las fitopatógenas

*Burkholderia glumae* y *Pectobacterium sp.* Este estudio representa una alternativa frente a los bactericidas y fármacos sintéticos de uso común, además la obtención de productos a partir de biomasa marina residual, proporcionando valor agregado de aplicación en la industria biomédica y farmacéutica y contribuyendo con la disminución de la contaminación ambiental producida por los desechos de crustáceos (Lemus et al., 2007; Rodríguez et al., 2009).

## Materiales y métodos

### Recolección del camarón

Diez muestras de 10 kg de residuos de exoesqueletos de camarones fueron colectadas en el municipio de Coveñas (Sucre), Colombia a 9°24'19.41"N y 75°40'38.83"O. Los exoesqueletos fueron depositados en recipientes estériles y transportados en refrigeración a los laboratorios de Fitoquímica y de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de Sucre, para su procesamiento y evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro*.

### Obtención de quitina

El exoesqueleto de camarón colectado, fue lavado con agua de grifo, para eliminar las impurezas y residuos. Se procedió a separarlo en tres partes: cefalotórax, pleópodo y telson, para su procesamiento, debido a que el telson y cefalotórax tienen mayor pigmentación y requieren de más tiempo para su tratamiento. Un kg de cada parte, se pesó para posteriormente medir el rendimiento de obtención de quitina. Una vez pesadas se trataron con una solución de HCl 2M por 8 horas a temperatura ambiente con agitación constante para su descalcificación. Posteriormente se utilizó papel de filtro (125 mm de diámetro) y se desechó el ácido, el material obtenido se lavó con agua hasta alcanzar pH neutro y dos veces con agua destilada, para purificar. Después se secó al sol por 8 horas y posteriormente se sumergió en un volumen de solución de NaOH 1N a 80°C por 8 horas con agitación constante, para eliminar las proteínas del caparazón. Nuevamente se filtró en papel y se descartó el álcali, y el material obtenido se lavó hasta alcanzar un pH neutro y finalmente se secó al sol por 8 horas (Lemus et al., 2007).

### Obtención del quitosano

Para la obtención del quitosano, se tomó la quitina obtenida en la etapa anterior se sumergió en volumen de solución de NaOH 50% a 115°C a reflujo con agitación constante por 24 horas, para eliminar las unidades acetilo. Posteriormente se filtró a través de papel y se desechó el álcali. El material obtenido se lavó con agua hasta alcanzar pH neutro; se secó al sol por 8 horas y por último se molió y se pesó (Lemus et al., 2007).

### Caracterización del quitosano

El grado de desacetilación del quitosano, fue medido empleando espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y se determinó su peso molecular a partir de la viscosidad intrínseca (Kasaai y Mohammad, 2009).

Para la determinación del grado de desacetilación del quitosano se empleó un espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)-84005 marca SHIMADZU en la región 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  de propiedad de la Universidad de Cartagena. En un mortero se mezcló 1 mg de muestra de quitosano con aproximadamente 100 mg de NaCl desecado y se pulverizó con un pistilo. Posteriormente se presionó la mezcla en un troquel entre 700 y 1000  $\text{Kg/cm}^2$  hasta obtener un disco transparente, que se ubica en la trayectoria del haz del instrumento para su examen espectroscópico (Skood et al., 2001). El grado de desacetilación del quitosano (DD) se calculó por la siguiente ecuación:  $\text{DD} = 100 - [(A_{1645}/A_{3500}) \times 115]$ , donde  $A_{1645}$  y  $A_{3500}$  son las absorbancias del pico correspondiente a la amina I y de la banda tomada como referencia, respectivamente.

La determinación del peso molecular del quitosano se realizó en un viscosímetro de Hoppler, a una temperatura constante de 25°C. Se prepararon muestras de quitosano disuelto en ácido acético a una concentración inicial de 1 g/dl. Una vez establecida las condiciones de trabajo se procedió a determinar el tiempo que tarda la esfera en recorrer una distancia de 5 cm, estando sumergida ésta en la solución polimérica. Luego la disolución preparada se diluyó hasta obtener concentraciones finales de 0.73, 0.6 y 0.45 g/dl y se determinó nuevamente el tiempo de caída de la esfera bajo las mismas condiciones. Este proceso se repitió 3 veces para asegurar la reproducibilidad de los resultados y se calculó la velocidad reducida con la Ecuación de Huggins:

$$n_{\text{red}} = \frac{(t - t_0)}{t_0} \times \frac{1}{c}$$

donde  $t$  y  $t_0$  corresponden al tiempo de caída de la esfera en la solución y en el disolvente. Posteriormente se graficaron las 4 concentraciones con sus respectiva viscosidad reducida, para poder hacer una buena regresión lineal y así obtener la viscosidad intrínseca. El peso molecular promedio viscosimétrico se calculó mediante la ecuación de Mark-Houwink  $[\eta] = K^*(M_v)^a$  (Ecuación 2), en que  $[\eta]$  es la viscosidad intrínseca y  $M_v$  es el peso molecular promedio. Los parámetros  $K$  y  $a$  son las llamadas constantes de Mark-Houwink y dependen del polímero, del disolvente y de la temperatura. Las constantes para  $a$  y  $k$  fueron 0.85 y  $13.8 \times 10^{-5}$  dl/g (Gartner y López, 2010).

### Preparación de soluciones de quitosano

Se prepararon concentraciones de quitosano disuelto en diferentes concentraciones de ácido acético de 1.0,

1.5, 2.0 y 2.5 % (v/v), siguiendo el diseño experimental indicado en la tabla 1. El pH de la solución de quitosano se ajustó a 4.5, mediante la adición de gotas de ácido acético y se esterilizó en autoclave marca ALL AMERICAN modelo 25X-I, a 15 lb/ 15 min.

### Bacterias evaluadas

Para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana del quitosano con sus diferentes tratamientos (tabla 1), se utilizaron siete bacterias, cinco de las cuales correspondieron a especies patógenas de humanos (*E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* UDS, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. oxytoca* ATCC 43863 y *K. oxytoca* ATCC 43086) y dos fitopatógenas *Pectobacterium* sp UDS y *B. glumae* 320012-CIAT.

**Tabla 1.** Diseño experimental de tratamientos utilizados para la actividad inhibitoria de las bacterias patógenas.

Tratamientos	Concentración de a. acético % (v/v)	Concentración de quitosano % (v/v)
T1	1	1
T2	1.5	1.5
T3		2.0
T4		2.5
T5		3.0
T6	2.0	3.5
T7		2.5
T8		3.0
T9		3.5

### Evaluación de la actividad inhibitoria del quitosano

La evaluación de actividad antibacteriana se realizó por el método de difusión en disco sobre agar, realizando siembra de las bacterias purificadas en medio sólido por medio de la técnica de Kirby-Bauer en agar Mueller-Hinton. La concentración de todas las bacterias fue del orden de  $10^8$  UFC/mL. Los discos estériles de papel filtro fueron sumergidos por un tiempo de 24 horas en los diferentes tratamientos (tabla 1), transcurrido este tiempo, en condiciones asépticas se depositaron sobre la superficie del agar. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C (Cuéllar y Hussein, 2009).

Para cada bacteria, se utilizó como testigo absoluto el ácido acético, control positivo con gentamicina 120 mg/mL y control negativo con agua destilada estéril. Los ensayos se realizaron por triplicado y la evaluación se hizo por medición del diámetro de las zonas de inhibición de crecimiento alrededor de los discos (mm). Para determinar la actividad antibacteriana del quitosano, a éste resultado se le restó el obtenido del ácido acético. La eficiencia de la actividad antibacteriana del quitosano fue comparada con el control positivo.

## Análisis estadístico

Para establecer relación de la actividad antibacteriana de los tratamientos en función de las bacterias, se realizó un ANOVA multifactorial. Se realizaron pruebas para determinar los factores que tuvieron un efecto estadístico significativo sobre la inhibición. Se evaluó la significancia de las interacciones entre los factores, las cuales fueron evidenciadas de acuerdo a los resultados de las pruebas- F obtenida mediante ANOVA. Los análisis fueron realizados mediante el programa estadístico R (R Development Core Team, R, 2009).

## Resultados

### Caracterización del quitosano

En la figura 1 se muestran los espectros FTIR (espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier) de la quitina y quitosano. En el caso de la quitina se presenta el espectro de absorción de la muestra desproteínizada y desmineralizada y quitosano corresponde a la muestra desacetilada.

La determinación del grado de desacetilación del quitosano se obtuvo mediante el uso de espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)-84005 marca SHIMADZU en la región 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . El grado de desacetilación del quitosano (DD) se calculó a través de la ecuación:  $\text{DD} = 100 - [(A_{1645}/A_{3500}) \times 115]$ , donde  $A_{1645}$  y  $A_{3500}$  son las absorbancias del pico correspondiente a la amina I y de la banda tomada como referencia, respectivamente.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la figura 1, se observaron bien definidos picos de absorción como: enlace C=O (1730 y 1680), grupo amida NH (3860 y 3740) y un pico de absorción débil correspondiente a las vibraciones de su estructura piranósica (1065), lo cual indica que en esta etapa efectivamente se tiene la quitina. No obstante, aparece un pico de absorción a 2350  $\text{cm}^{-1}$ , que no corresponde a ningún grupo funcional presente en la estructura de la quitina; posiblemente producto de componentes traza de eta-

pas anteriores. Así mismo se observaron bandas que permitieron evidenciar los grupos funcionales característicos de la molécula de quitosano: grupos OH a 3500  $\text{cm}^{-1}$ , N-H a 3220  $\text{cm}^{-1}$ , C-H a 2877  $\text{cm}^{-1}$ , C-O-C a 1153  $\text{cm}^{-1}$ , grupo piranósico a 1065  $\text{cm}^{-1}$  y grupo amina a 1645 y 1430  $\text{cm}^{-1}$ . Además se evidencia que en las dos estructuras se mantienen presentes las señales correspondientes a C-H alifático y al anillo piranósico, mientras que las bandas correspondientes al grupo NH (1430 y 1645  $\text{cm}^{-1}$ ) de la amina, se definen mejor después que la muestra se sometió al proceso de desacetilación, es decir en la obtención de quitosano.

### Determinación del peso molecular del quitosano

La ecuación encontrada para la determinación el peso molecular del quitosano a partir de la viscosidad intrínseca fue  $Y = 0.2174X + 1.4489$ , con  $R^2 = 0.9894$ . Se observa, que la viscosidad reducida se incrementó a medida que la concentración del quitosano aumenta. El coeficiente de correlación (r) fue igual a 0.9894; lo que indica que la regresión es una función lineal, dado que su valor es mayor de 0.95, es decir que sus variables son directamente proporcionales.

El intercepto con el eje de las (y) proporciona el resultado de la viscosidad intrínseca, la cual es igual a 1.4489 dl/g; este dato reemplazado en la expresión:

$$Mv = \left( \frac{[\eta]}{13.8 \times 10^{-5}} \right)^{\frac{1}{0.85}}$$

(Ecuación 2) (Parada et al., 2004), permitió obtener el peso molecular del quitosano el cual correspondió a 53800 g/mol.

### Actividad antibacteriana del quitosano

En la tabla 2 se muestra los resultados de medias de actividad antibacteriana (mm) en relación a tipo de bacteria y tratamiento con intervalos de confianza del 95.0%.

Los resultados de la actividad antibacteriana del quitosano sobre diferentes grupos de bacterias patógenas

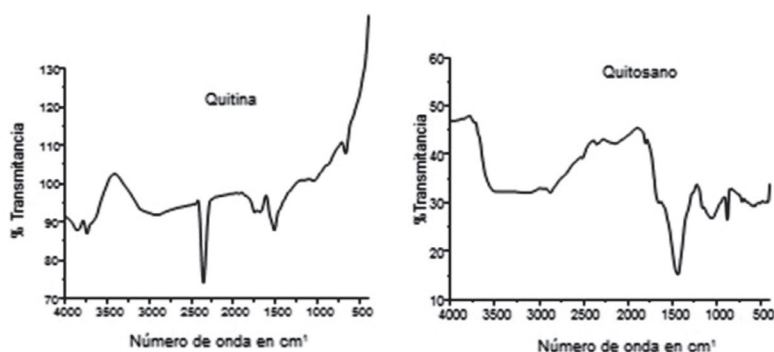


Figura 1. Espectros FTIR de muestra de quitina y quitosano.



(tabla 2), se observan que las bacterias *B. glumae*, *Pectobacterium* sp y *E. faecalis*, mostraron valores menores medios de inhibición en mm de 0.0, 0.0 y 0.3704, respectivamente al quitosano; mientras que *P. aeruginosa* (2.1852), *E. coli* (4.8889) *K. oxytoca* ATCC 43086 (9.2963) y *K. oxytoca* ATCC 43863 (9.3333), presentaron mayores valores medios de inhibición al quitosano. Se observa además, que el efecto inhibitorio fue mayor en las bacterias Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. oxytoca* ATCC 43086 y *K. oxytoca* ATCC 43863), que en Gram-positiva (*E. faecalis*). Sin embargo, no todas las bacterias Gram-negativas fueron inhibidas.

Al comparar la eficiencia de inhibición del quitosano con relación al control químico con gentamicina 120 mg/ml, se observó mayor formación de halo de inhibición para *K. oxytoca* ATCC 43863, *K. oxytoca* 43086 y *E. coli* en los pozos 1 de cada bacteria como se muestran en la figura 2, indicando que la eficiencia de la actividad antibacteriana del quitosano es similar al efecto que produjo la gentamicina (pozo 4). De otra parte se observó además, que la actividad inhibitoria de es atribuida directamente al quitosano, y no al ácido acético (pozo 2), en el cual no se mostró ningún efecto inhibitorio sobre las especies de bacterias evaluadas. En la misma figura se observa que en *Burkholderia glumae* no se hubo ninguna actividad inhibitoria por parte de las soluciones ácidas de quitosano ni para el control químico.

La actividad antibacteriana de las diferentes concentraciones de quitosano disuelto en ácido acético, señalan que el tratamiento correspondiente a concentraciones de 1.0% de quitosano disuelto en 1.0% ácido acético ( $T_1$ ) no fue efectivo, dado que no hubo inhibición para ninguna de las bacterias; en orden de efectividad le siguieron los tratamientos  $T_2$  y  $T_6$  con un mínimo efecto inhibitorio, destacándose el hecho de que en estos 3 tratamientos se hizo una relación 1:1 de quitosano y ácido acético (tabla 2). En los demás tratamientos  $T_3$ ,  $T_4$ ,  $T_5$ ,  $T_7$ ,  $T_8$ ,  $T_9$  en donde las concentraciones de quitosano están por encima de las del ácido acético, la actividad de inhibición fue aumentando; destacándose  $T_7$  y  $T_9$ , es decir a concentraciones 2.5 y 3.5% de quitosano, disuelto a una misma concentración de ácido acético igual al 2%.

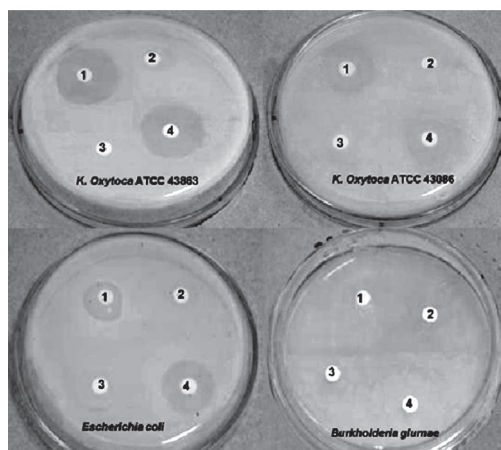
Además, se observan que los tratamientos  $T_4$  y  $T_7$  aunque tienen concentraciones iguales de quitosano (2%), disuelto en distintas concentraciones de ácido acético (1.5 y 2.0% respectivamente), se observa que el tratamiento  $T_7$  presentó mayor inhibición. Resultado similar mostró el tratamiento  $T_8$ , el cual presentó mayor efecto inhibitorio que el tratamiento  $T_5$ , encontrándose estos a concentraciones iguales de quitosano (3%), disuelto en distintas concentraciones de ácido acético (2.0 y 1.5%. respectivamente).

## Discusión

Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana de las soluciones ácidas de quitosano se convierten en un potencial biológico para la inhibición de bacterias pa-

tógenas. El peso molecular del quitosano obtenido mediante la ecuación lineal de viscosidad intrínseca fue de 53800 g/mol, este valor encontrado es similar al obtenido en el trabajo realizado por Gartner y López, (2010) y se encuentra en el rango de  $10^5$  a  $5 \times 10^3$  g/mol determinado por Pacheco, (2010). Trabajo realizado por Pacheco, (2013) sobre la determinaciones *in vitro* del efecto de quitosanos con diferentes pesos moleculares y grados de acetilación, mostraron que el quitosano de peso molecular medio (400 g/mol) inhibió al hongo *P. digitatum* durante la etapa de germinación de esporas, y que en combinación con un agente de biocontrol como la levadura (*Pichia guilliermondii*) la inhibición se observa durante la etapa de crecimiento radial. Estos resultados obtenidos sobre el valor del peso de quitosano encontrados en el presente estudio demuestran que quitosano evaluado presentó un peso molecular de acuerdo a la comparación con el estudio citado anteriormente.

Los resultados de actividad antimicrobiana del quitosano sobre diferentes grupos de bacterias analizadas en este estudio, confirman la eficiencia de este producto como lo demuestran estudios llevados a cabo por Hong et al., (2002), quienes al evaluar la actividad inhibitoria *in vitro* de seis muestras de quitosano y seis de oligómeros de quitosano con diferentes pesos moleculares sobre cuatro bacterias Gram positivas (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* y *L. bulgaricus*) y cuatro Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, y *Vibrio parahaemolyticus*), demostraron que el quitosano inhibió el crecimiento de la mayoría de las bacterias probadas, además, los efectos inhibitorios de este variaron con respecto al peso molecular, concentración y especie de bacteria estudiada.



**Figura 2.** Resultados de actividad antibacteriana del quitosano sobre bacterias patógenas. 1: quitosano, 2: Ácido acético, 3: testigo absoluto, 4: control positivo (gentamicina 4 mg/mL). Fuente Pérez 2012.



**Tabla 2.** Medias de actividad antibacteriana (mm) en relación a tipo de bacteria y tratamiento con intervalos de confianza del 95.0%

Nivel	Casos	Media	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
Media global	189	3.72487			
<b>Bacterias</b>					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	27	2.1852	0.5955	1.00988	3.3605
<i>Enterobacter faecalis</i> ATCC 29212	27	0.3704	0.5955	-0.804937	1.5457
<i>Burkholderia glumae</i>	27	0.0	0.5955	-1.17531	1.1753
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 43086	27	9.2963	0.5955	8.12099	10.4716
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 43863	27	9.3333	0.5955	8.15803	10.5086
<i>Escherichia coli</i>	27	4.8889	0.5955	3.71358	6.0642
<i>Pectobacterium</i> sp.	27	0.0	0.5955	-1.17531	1.1753
<b>Tratamientos</b>					
T <sub>1</sub> : 1%(v/v) ácido acético + 1%(v/v) de quitosano	21	0.0	0.67522	-1.33267	1.3327
T <sub>2</sub> : 1%(v/v) ácido acético + 1.5%(v/v) de quitosano	21	1.7619	0.67522	0.429232	3.0946
T <sub>3</sub> : 1.5%(v/v) ácido acético + 2.0%(v/v) de quitosano	21	3.1904	0.67522	1.8578	4.5232
T <sub>4</sub> : 1.5%(v/v) ácido acético + 2.5%(v/v) de quitosano	21	3.2381	0.67522	1.90542	4.5708
T <sub>5</sub> : 1.5%(v/v) ácido acético + 3.0%(v/v) de quitosano	21	4.3333	0.67522	3.00066	5.6660
T <sub>6</sub> : 1.5%(v/v) ácido acético + 3.5%(v/v) de quitosano	21	2.3809	0.67522	1.04828	3.7136
T <sub>7</sub> : 2.0%(v/v) ácido acético + 2.5%(v/v) de quitosano	21	6.8095	0.67522	5.47685	8.1422
T <sub>8</sub> : 2.0%(v/v) ácido acético + 3.0%(v/v) de quitosano	21	6.0	0.67522	4.66733	7.3327
T <sub>9</sub> : 2.0%(v/v) ácido acético + 3.5%(v/v) de quitosano	21	5.8095	0.67522	4.47685	7.1422

Trabajos realizados por Helander, (2001), sobre la acción antimicrobiana del quitosano de alto peso molecular, sobre bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium*); corroboro que el quitosano al tener un ion positivo con una base amino (NH<sub>2</sub>), se une a los aniones presentes en la membrana externa de las bacterias e inhibe la absorción y transporte de nutrientes al interior de la célula. De las bacterias evaluadas en este ensayo, las especies de *K. oxytoca*, provenientes de diferentes fuentes, mostraron mayor susceptibilidad a los tratamientos con quitosano y diferencias en el grado de susceptibilidad entre ellas, *K. oxytoca* ATCC 43086, mostró valores medios de inhibición mayores con respecto a *K. oxytoca* ATCC 43863, esto confirma, que el efecto inhibitorio

del quitosano varía entre especies y entre miembros de una misma especie (intraespecífica).

Los datos obtenidos, indican que el efecto del quitosano depende no solo de la especie de bacteria y la fuente de procedencia; sino además, del tipo de hospedero, sustentado esto, por los resultados de resistencia obtenidos sobre las bacteria fitopatógenas evaluadas, como el caso de *Pectobacterium spp.* y *B. glumae*, las cuales se han convertido en uno de los fitopatógenos de mayor importancia agrícola, por su impacto económico y por la resistencia de manejo en campo (Pérez y Saavedra, 2011).

Los resultados obtenidos de las diferentes concentraciones evaluadas de quitosano, sugieren, que aquellos que tienen concentraciones de quitosano iguales a las

concentraciones de ácido acético, no son tan efectivos, como aquellos, en los cuales las concentraciones de quitosano están por encima de las del ácido acético. De igual manera se muestra que a una misma concentración de ácido acético y concentraciones mayores del quitosano se encontró la mayor actividad antibacteriana de este compuesto, para la mayoría de las bacterias evaluadas; coincidiendo estos resultados con los realizados por Ming *et al.*, (2008), quienes evaluaron el mecanismo antibacteriano de microesferas de quitosano sobre *E. coli*; concluyendo que la actividad antibacteriana fue directamente proporcional a la concentración de las microesferas del polímero.

Aunque el ácido acético no es el que ocasiona la inhibición, si juega un rol muy importante dado que a mayor concentración de ácido acético mayor es la solubilidad del polímero y la protonación de los grupos-NH<sub>2</sub>. Estos resultados coinciden con los encontrados por Ying *et al.*, (2003), quienes evaluaron el efecto de factores abióticos como el pH y la fuerza iónica, en la actividad antimicrobiana del polímero sobre las bacterias *E. coli* y *Staphylococcus aureus*; concluyendo que la actividad antibacteriana del quitosano depende significativamente de sus cargas y solubilidad.

La actividad antibacteriana de soluciones ácidas de quitosano obtenidas a partir del exoesqueleto de camarón se convierte en una posible alternativa biológica para el Caribe Colombiano, dado que los otros estudios realizados se han direccionado hacia la actividad antibacteriana del quitosano obtenida sintéticamente. Estudios posteriores serán realizados utilizando quitosano de diferentes pesos moleculares (bajo, medio y alto), sobre otros patógenos de importancia clínica y agrícola para el departamento de Sucre y la región Caribe Colombiana.

## Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos, a los laboratorios de Fitoquímica y de Investigaciones Microbiológica de la Universidad de Sucre y a la Universidad de Cartagena.

## Bibliografía

Álvarez L., 2007. Infecciones de vías urinarias en el hospital universitario del Norte. *Salud Uninorte*. 23: 9-18.

Bin L., Xiao W., Ruoxia Ch., Weiguo H., Guanlin X. 2008. Antibacterial activity of chitosan solution against *Xanthomonas* pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*. *Carbohydrate Polymers*, 72:287-292.

Cuéllar A., Hussein R. 2009. Evaluation of the yield and the antimicrobial activity of the essential oils from: *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon citrates* and *Rosmarinus officinalis* in mbarara district (Uganda). *Revista Colombiana de Ciencias Animal-Recrea*. 1(2): 240-249.

Fernandes J., Eaton P., Gomes A., Pintado M., Malcata F. 2009. Study of the antibacterial effects of chitosans on *Bacillus cereus* (and its spores) by atomic force microscopy imaging and nanoindentation. *Ultramicroscopy*, 109: 854-860.

Gartner C., López B. 2010. Medidas de la rigidez del quitosano en solución a través de la viscosidad intrínseca. *Revista facultad de ingeniería universidad de Antioquia*. 53: 20-29.

Helander I. 2001. Chitosan Disrupts the Barrier Properties of the outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 71:235-244.

Hong N., Young N., Shin L. 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*. 74: 65-72.

Kasaai J., Mohammad R. 2009. Various Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 1667-1676.

Láirez C.m Sánchez J., Millán Y. 2008. Viscosimetric Studies of Chitosan Mitrato and Chitosan Chlorhydrate in Acid free NaCl Aqueous Solution. *Polymers*. 14:25-28.

Lemus J., Martínez L., Navarro M., Posadas A. 2007. Obtención y uso de quitosano para tratamientos dérmicos a partir de exoesqueleto de camarón. *Boletín electrónico* N° 7. 7:1-9.

Ming K., Xi G., Chen C., Chen G., Xiang H., Le J. 2008. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. *Colloids Surf Biointerfaces*. 65:197-202.

Pacheco N. 2010. Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos: Caracterización y aplicación. [Trabajo de tesis doctoral]. UAM-Iztapalapa, México, Ingeniería des Matériaux Polymères, UCB- Lyon 1 France. [http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/80/79/45/PDF/TH2010\\_Pacheco\\_-\\_Lopez\\_-\\_Neith\\_-\\_Aracely.pdf](http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/80/79/45/PDF/TH2010_Pacheco_-_Lopez_-_Neith_-_Aracely.pdf).

Parada L., Acosta C., Canjura O., Katime I. 2004. Estudio de miscibilidad en mezclas de diferentes poli (mono-itaconatos de N-alquilo) con poli(vinilpiridinas). *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 5:153-165.

Pérez C., Saavedra E. 2011. Avances en el manejo integrado de la bacteria *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz en el caribe colombiano, *Rev. Colombiana cienc. Anim.* 3(1): 111-124.

Pillai C., Paul W., Sharma Ch. 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34:641-678.

Queipo J., Budía A., Máscaros E., Gómez-Ferrer A., Gobernado M., Jiménez J. 2000. Evolución de la resistencia microbiana a fluorquinolonas en un hospital terciario. *Actas Urológica Española*. 24:381-387.

R Development Core Team, R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, 2009, Vienna, Austria. ISBN 3-900051. Disponible en URL: \* <http://spatial-analyst.net/book/biblio/author/650>.

Rodríguez A., Ramírez MA., Rivero GD., Bosquez ME., Barrera N., Bautista B. 2009. Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosano en microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo serie horticultura*. 15(3):307-317.

Skood D., Holler F., Nieman T. 2001. Principio de Análisis Instrumental. España, Mc Graw- Hill / interamericana, p. 1038.

Soro L. 2007. Estudio de la obtención de Quitosano a partir de Caparazón de Camarón (*Penaeus vannamei*) y su aplicación en la estabilidad de una emulsión aceite en agua. [Trabajo de grado]. Ecuador, Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del Litoral. DOI:handle/123456789/1258.

Ying Ch., Huey L., Yen M., Song L. 2003. Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresource Technology*. 88:179-184.

# Evaluación de la patogenicidad de *Xenorhabdus* spp. nativos en Colombia

## Evaluation of pathogenicity *Xenorhabdus* spp. natives in Colombia

Beatriz Elena Guerra S. \*, Julie Giovanna Chacón \*\*, Jaime Eduardo Muñoz F. \*\*\*, Ana Milena Caicedo \*\*\*\*

### Resumen

Las bacterias *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* están asociadas simbióticamente con nematodos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae respectivamente. Se caracterizan por producir un complejo de sustancias como toxinas, antibióticos y enzimas extracelulares que matan los insectos. Con el objetivo de seleccionar los nematodos más patógenos y su nivel de producción de antibióticos se propuso evaluar la patogenicidad de 13 aislamientos nativos. Las bacterias se aislaron de juveniles infectivos (JIS) por macerado directo, se cultivaron en medios microbiológicos selectivos (NBTA y MacConkey) y se describieron fenotípica y bioquímicamente. La patogenicidad se evaluó en larvas de último instar de *G. mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), mediante diluciones seriadas de inóculo bacteriano con una concentración de  $10^4$  cel/ml. Se registró el porcentaje de mortalidad a las 12, 24 y 48 horas y las unidades formadoras de colonia (UFC) en agar NBTA, en los mismos intervalos de tiempo. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y a la prueba de comparación de medias de Duncan. Las pruebas bioquímicas y enzimáticas resultaron positivas para el género *Xenorhabdus*. Los análisis estadísticos mostraron que los aislamientos, UNPX04, UNPX15 provenientes de La Florida-Risaralda y Llano Bajo-Valle del Cauca respectivamente, causaron el 100 % de mortalidad a las 12 y 24 horas en contraste con siete aislamientos que causaron sólo el 70% de mortalidad.

**Palabras clave:** antibióticos, manejo, steinernema, virulencia.

### Abstract

*Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria are symbiotically associated with nematodes of the Steinernematidae and Heterorhabditidae families respectively. They are characterized by producing a complex of substances such as toxins, antibiotics and extracellular enzymes that kill insects. In order to select the most pathogenic nematodes and antibiotic production level, it was proposed to evaluate the pathogenicity of 13 native isolates. Bacteria were isolated from infective juveniles (JIS) by direct maceration, cultured on selective media (NBTA and MacConkey) and described phenotypic and biochemically. The pathogenicity was evaluated on the last instar larvae of *G. mellonella*, using serial dilutions of the bacterial inoculum with a concentration of  $10^4$  cel/ml. The mortality rate was registered at 12, 24 and 48 hours and the colony forming units (CFU) in NBTA agar in the same intervals of time. The data were analyzed by variance analysis and mean comparison by Duncan test. Biochemical and enzymatic tests were positive for the genus *Xenorhabdus*. The results showed that the isolates UNPX04, UNPX15 from agricultural soils of Florida-Risaralda and Llano Bajo-Valle del Cauca respectively, caused 100% of mortality at 12 and 24 hours in contrast with seven isolations that caused only 70% of mortality.

**Key words:** antibiotics, management, steinernema, virulence.

**Recibido:** septiembre 23 de 2013      **Aprobado:** abril 25 de 2014

\* PhD(c). Laboratorio de innovación e investigación en biotecnología agroambiental, Grupo Microbiota- Universidad de Santander, Bucaramanga, Colombia-bguerra@udes.edu.co  
 \*\* Microbióloga Industrial, Laboratorio de innovación e investigación en biotecnología agroambiental, Grupo Microbiota- Universidad de Santander, Campus Universitario lagos del cacique- bloque Guane, Bucaramanga, Colombia.juliechao@msn.com  
 \*\*\* Ph.D. Grupo de Investigación en Diversidad Biológica Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira Colombia. jemunozf@palmira.unal.edu.co  
 \*\*\*\* Ph.D. Grupo de Investigación en Diversidad Biológica Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira Colombia. anam.caicedo@gmail.com

## Introducción

Los nematodos (entomopatógenos (neps) de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* son utilizados para el manejo de un amplio rango de especies de insectos-plaga de importancia agrícola (Hazir et al., 2003). El mecanismo por el cual estos organismos infectan y se reproducen en los insectos hospederos involucra una relación mutualística entre el nematodo y las bacterias simbióticas *Xenorhabdus spp* y *Photorhabdus spp*. (Akhurst y Dunphy, 1993; Forst y Nealson, 1996; Adams et al., 2006; Chaston et al., 2011). Las bacterias se caracterizan por ser Gram-negativas, anaerobias facultativas, no forman espores, presentan numerosos pelos flagelares y sólo se recuperan de los infectivos juveniles (IJS) o de hospederos infectados (Akhurst y Boemare, 1990; Hinchliffe et al., 2010).

Además de ser patógenas a insectos (Boemare y Akhurst, 1988; Burnell y Stock, 2000; Hinchliffe et al., 2010), producen metabolitos antimicrobianos (Webster et al., 1998), antibióticos de bajo peso molecular y enzimas extracelulares como proteasas, lipasas, fosfolipasas y DNAsas. Estos compuestos están involucrados en la destrucción de tejidos de insectos que son utilizados como alimento para los neps (Forst y Nealson, 1996; Adams et al., 2006; Hinchliffe et al., 2010).

El rango de actividad antibiótica es variable y depende de la especie bacteriana y de la fase de desarrollo (Akhurst 1982). Aunque los IJS juegan un papel importante en la muerte del insecto al transportar la bacteria, la cual es suficiente para causar mortalidad cuando es inyectada al hemocele del insecto (Gotz et al., 1981).

Estudios realizados han demostrado que la suspensión bacteriana es tóxica a especies de insectos como la hormiga de fuego, *Solenopsis invicta* (Hym:Formicidae), asperjadas sobre hojas de algodón (*Gossypium hirsutum*) (Dudney 1997) y sobre larvas y pupas de *Spo-doptera exigua* (Elawad et al., 1999). Asimismo, la aplicación de células en solución y el filtrado bacterial de *Xenorhabdus nematophila* en suspensión acuosa fue letal a las larvas de *Plutella xylostella* (Lep.:Plutellidae). Su aplicación sobre hojas de *Brassica oleracea* var. *Chinese* mostraron que las células pueden penetrar en los insectos en ausencia del nematodo. Las soluciones libres de células bacteriales que contenían los metabolitos también fueron efectivas, lo cual representa una posible estrategia para el control de insectos sobre el follaje (Mahar et al., 2004).

De igual manera, Yi y Ehlers (2006) evaluaron el potencial de la aplicación de *Bacillus thuringiensis* en mezcla con *X. nematophila* sobre larvas de tercer instar de *P. xylostella*. Se considera que los patógenos de insectos son una fuente de nuevos agentes insecticidas que proporcionan toxicidad. Especialmente las bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* son consideradas como una mina de oro, que codifican una multitud de toxinas insecticidas. Algunas altamente es-

pecíficas a determinadas especies de insectos y otras más generalistas, pero con gran potencial de uso en la protección de cultivos. Además, estas bacterias están equipadas para producir un vasto rango de compuestos antimicrobiales los cuales también podrían usarse en la ciencia médica (Bowen y Ensign, 1998; French y Bowen, 1999; Ensign et al., 2002; Hinchliffe et al., 2010).

Considerando el potencial bio-controlador de estas bacterias, se propuso caracterizar morfológica y bioquímicamente aislamientos nativos obtenidos de suelos dedicados al cultivo de *Bactris gasipaes* K, chontaduro y en guaduales, *Guadua angustifolia* Kunth. Así mismo, evaluar su patogenicidad sobre larvas de *G. mellonella*, (insecto hospedante de fácil manejo y reproducción) como una preselección *in vitro* del potencial que permita su implementación en opciones de manejo de insectos-plaga en nuestro país.

## Materiales y métodos

### *Nematodos entomopatógenos*

Los 13 aislamientos de Neps fueron reactivados del cepario del laboratorio de biología molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira que se encuentra a 4 °C, la procedencia de cada aislamiento se presenta en la tabla 1. Para su reactivación se utilizaron larvas de último instar de *G. mellonella* (insecto sobre el cual está estandarizado la producción *in vivo* y sobre las larvas de último instar por su mayor tamaño, lo cual garantiza una mayor producción de neps). La reactivación se realizó de acuerdo a la metodología de Kaya y Stock (1997). Cada aislamiento se inoculó sobre 20 larvas de *G. mellonella* con una solución de 200 IJS/ml en cajas Petri de 100 mm y papel toalla estéril mantenidas en oscuridad durante 7-10 días con condiciones de 23 °C±3 de temperatura y 65% ± Humedad Relativa (HR). Los IJS se recuperaron de las trampas White y se almacenaron en agua destilada estéril a 4°C durante 7 días antes de iniciar el proceso de aislamiento de las bacterias.

### *Aislamiento y purificación bacteriana*

Las bacterias se aislaron mediante la técnica modificada de macerado de IJS (Boemare et al., 1997), la cual consistió en la desinfección de 100 IJS por inmersión en una solución de hipoclorito de Sodio (NaClO) al 3% , durante 3±1 min , seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente, 40 IJS se adicionaron en una gota de hemolinfa de *G. mellonella*. Se maceraron con un pistilo estéril y se sembraron 100 µl en agar NBTA (Agar Nutritivo; 25 mg Azul de Bromotimol; 40 mg; 1000 ml agua destilada Cloruro de Trifeniltetrazolium), y se incubaron en la oscuridad a 28 °C durante 72 h.



**Tabla 1.** Procedencia de los nematodos entomopatógenos

Aislamiento	Temperatura °C	Origen	Nematodo
UNPS 01	14	La Florida-Risaralda	<i>Steinernema</i> sp.
UNPS 02	24	Villa pinzón-Cundinamarca	<i>S. feltiae</i>
UNPS 03	10	All strain UK	<i>S. carpocapsae</i>
UNPS 04	14	La Florida, Risaralda	<i>Steinernema</i> sp.
UNPS 06	14	La Florida-Risaralda	<i>Steinernema</i> sp.
UNPS 07	26	Guadual. El overo, Risaralda	<i>Steinernema</i> sp.
UNPS 08	26	Guadual. El overo, Risaralda	<i>Steinernema</i> sp.
UNPS 09	26	Guadual. El overo, Risaralda	<i>Steinernema</i> sp.
UNPS 10	26	Guadual. El overo, Risaralda	<i>Steinernema</i> sp.
UNPS 11	26	Guadual. El overo, Risaralda	<i>Steinernema</i> sp.
UNPS 12	30	Buenaventura, Valle del cauca	<i>Steinernema</i> sp.
UNPS 13	30	Cisneros, Valle del cauca	<i>Steinernema</i> sp.
UNPS 15	30	Llano bajo, Valle del cauca	<i>Steinernema</i> sp.

### Caracterización fenotípica y bioquímica de las bacterias

La caracterización fenotípica de la forma primaria de las bacterias, se realizó con tinción de Gram, pruebas bioquímicas de motilidad, actividad proteasa, lipasa y lecitinasa, producción de antibióticos y la detección de la bioluminiscencia sugeridas por Boemare *et al.* (1997) y Arkhurst (1980). Adicionalmente, se realizaron siembras por estrías en medio MacConkey para observar la capacidad de absorción del rojo neutro. La absorción de Azul de Bromotimol y la reducción del Cloruro de Trifeniltetrazolium se evaluó en medio NBTA (Boemare *et al.*, 1997).

La prueba de motilidad se evaluó en medio semisólido, para determinar la presencia de flagelos. La actividad proteasa en agar-gelatina, la actividad lipasa en Tween 80, la lecitinasa en agar nutritivo suplementado con yema de huevo al 10%, la luminiscencia se determinó por observación de las colonias en agar nutritivo en un cuarto oscuro por 10 minutos y la producción de antibióticos se evaluó por la medición del halo de inhibición de crecimiento frente a *B. thuringiensis* (suministrada como cepa en crecimiento en caja Petri, no en formulación comercial, por la empresa Bioecológicos del Valle del Cauca).

### Evaluación de la patogenicidad

Se inocularon larvas de último instar de *G. mellonella* con una jeringa de insulina cargada con 10 µl de solución de cada aislamiento bacteriano con una concentración de 10<sup>4</sup> cel/ml. La inoculación se realizó a la altura del último par de patas. Las larvas se individualizaron en vasos plásticos de 4 onzas. La mortalidad se registró a las 12, 24 y 48 h después de inoculadas. El

diseño experimental fue de tipo factorial, con seis larvas por unidad experimental y cinco repeticiones en el tiempo (6 larvas x 14 tratamientos (13 aislamientos y el control) x 3 tiempos y 5 repeticiones= 1260). El control se inoculó con 10 µl de solución Ringer (9 g NaCl, 0.4 g KCl, 0.4 g CaCl<sub>2</sub>, 0.2 g NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en un litro de agua) (Kaya y Stock, 1997).

El crecimiento bacteriano dentro de la larva se evaluó en términos de UFC, sembrando una gota de hemolinfa de larvas (previamente desinfectadas en Hipoclorito al 3%, durante 3 min) en medio NBTA a las 12, 24 y 48 h, después de la inoculación. El diseño experimental y los tratamientos fue igual al del ensayo anterior.

### Análisis estadístico

Los datos se sometieron a un análisis de varianza y a la prueba de comparación de medias de Duncan. Se analizó la interacción entre: (i) los 13 aislamientos bacterianos y los tres tiempos con la mortalidad de larvas; (ii) los 13 aislamientos bacterianos y los tres tiempos evaluados en la curva de crecimiento bacteriano.

### Resultados y discusión

Los 13 aislamientos bacterianos presentaron los principales rasgos fenotípicos descritos para el género *Xenorhabdus* (Akhurst y Boemare, 2005) de la familia Enterobacteriaceae. Los miembros de esta familia son bacilos Gram-negativos anaerobios facultativos, negativos para oxidasa, no forman esporas, heterótrofos quimiorgánicos con metabolismo fermentativo y respiratorio y con la excepción de unos pocos miembros, son motiles por flagelos peritricos (Brenner, 1999). *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* son típicos de la familia

Enterobacteriaceae y ningún otro miembro de esta familia es fenotípicamente similar (Holt *et al.*, 1994). Por ejemplo, *Xenorhabdus* es negativo para catalasa, similar solamente a *Shigella dysenteriae* y la mayoría de *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* son negativos para nitrato reductasa, característica compartida solamente con algunas cepas de *Erwinia* y *Yersinia* (Boemare, 2002; Brenner, 1999). La diferencia más marcada entre los dos géneros es que la mayoría de los aislamientos de *Photorhabdus* son bioluminiscentes y catalasa positivos mientras que *Xenorhabdus* son negativos para ambas características (Forst *et al.*, 1997). Ambos géneros producen formas fenotípicas variables. La forma primaria o fase I es la forma naturalmente asociada con los nematodos, mientras que la forma secundaria o fase II puede aparecer espontáneamente cuando la bacteria está en cultivo. Las diferencias entre las fases son que en fase I la bacteria produce antibióticos, adsorbe ciertos colorantes y tiene inclusiones intracelulares compuestas de proteínas cristalinas, mientras que la fase II, no adsorbe colorantes, no produce antibióticos y produce inclusiones intracelulares ineficientemente. La forma de la colonia son diferentes y la diferencia en patogenicidad se ha observado sobre algunos hospederos (Volgyi *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 2006; Thomas y Poinar, 1979), lo que demuestra su relación con los neps del género *Steinernema* (figura 1A).

Las células bacterianas aisladas mostraron movilidad en las pruebas de agar semisólido y al exámen microscópico se identificaron como bacilos Gram negativos con cuerpos de inclusión (figura 1B). Las prueba lipasa, lecitinasa (figura 1C) y proteasa fueron positivas para todos los aislamientos.

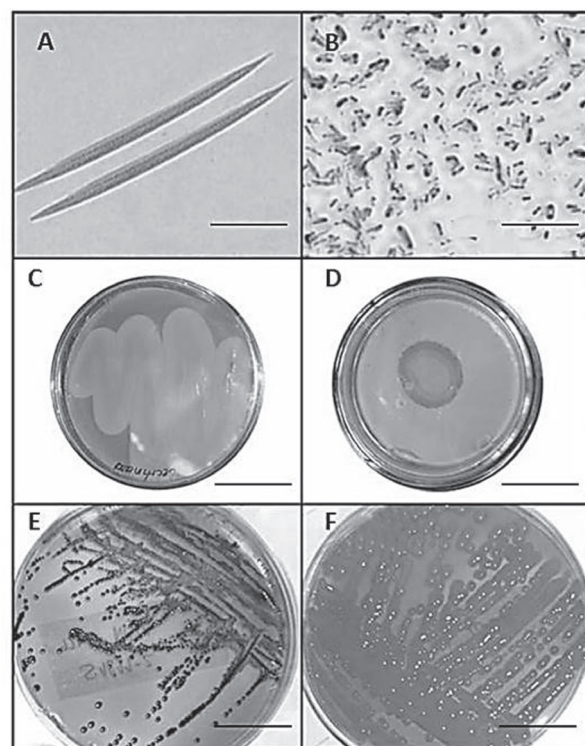
Los aislamientos mostraron la capacidad de producir antibiótico para inhibir el crecimiento de *B. thuringiensis* (figura 1D), mostrando diferencias en los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento. La luminiscencia fue negativa para todos los aislamientos (tabla 2) del género *Steinernema* sólo las bacterias del género *Photorhabdus* son las únicas bacterias terrestres bio-luminiscentes.

Las colonias en medio NBTA (figura 1E) mostraron una coloración azul (Fase I), por absorción del Azul de Bromotimol, a excepción del aislamiento UNPX12 cuya coloración fue verde-azulada, lo cual de acuerdo a Kaya y Stock (1997) depende de la especie bacteriana. La forma de las colonias para todos los aislamientos fue redondeada, convexa, con borde definido, de color claro y 2 mm de diámetro aproximadamente (figura 1F). En medio MacConkey las colonias presentaron un tamaño de 4 mm de diámetro y se evidenció la absorción del Rojo Neutro y fermentación de la Lactosa, por la coloración rojiza de las colonias y viraje del medio. El crecimiento de las colonias fue lento, se observó crecimiento de colonias a partir de 72 h, en todos los medios evaluados. Esta descripción concuerda con los resultados encontrados por Campos *et*

*al.* (2009) donde todos los aislamientos obtenidos a partir del macerado de IJS de neps mostraron coloración azul por absorción de pigmentos del medio, pero contrasta con lo reportado por Gerritsen *et al.* (1992) en la obtención de colonias rojas de *Xenorhabdus* spp. pertenecientes a formas variantes de la fase primaria.

La mortalidad de larvas de *G. mellonella* en el tiempo y entre aislamientos, fue analizada mediante la prueba de Duncan (tabla 3), resultando significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) y se incrementó con el paso del tiempo de una manera diferencial en cada aislamiento, como se observa en la figura 2.

El máximo porcentaje de mortalidad en el menor tiempo se logró con los aislamientos UNPX04 y UNPX15 (figura 2), las cuales empezaron a causar la muerte en larvas de *G. mellonella* por septicemia a partir de 12h después de la inoculación, ambas con un número de UFC superior a  $10^6$  cell/ml. A pesar que otros aislamientos presentaron similitud en el número de UFC, no presentaron virulencia a las 12 h (tabla 4). Siete de los 13 aislamientos mostraron porcentaje de mortali-



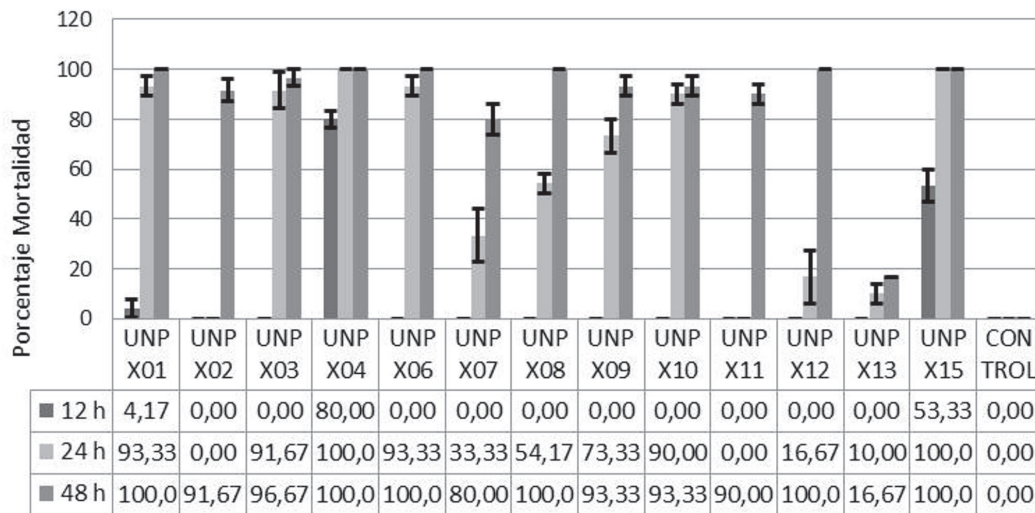
**Figura 1.** (A) IJS de *Steinernema* sp. UNP013. Barra=100  $\mu$ m (B) Bacilos Gram negativos con cuerpos de inclusión. Barra=20  $\mu$ m (C) Prueba de lecitinasa, alrededor de las colonias se observa la precipitación del medio. (D) Halo de inhibición de crecimiento por producción de antibióticos. Barra C y D=400mm (E) Crecimiento de *Xenorhabdus* sp. Fase I en medio NBTA. (F) Crecimiento de *Xenorhabdus* sp. Fase I en medio McConkey. Barra E y F=300mm

dad mayor del 70% a las 24 h de inoculación, lo cual contrasta con lo obtenido por Campos *et al.* (2009) al evaluar *X. bovienii* ES14 aplicando el doble del volumen (20 µl) y la misma concentración sobre larvas de *S. littoralis*, alcanzando una mortalidad del 80% a las 24 h. Los resultados contrastan con los obtenidos por Mahar *et al.* (2005) quienes obtuvieron una mortalidad del 93% de *G. mellonella* con inoculaciones de *X. nematophila* a una concentración de  $4 \times 10^7$  cel/ml comparado con el 100% de mortalidad obtenido con los aislamientos nativos de UNPX04 de la Florida, Ri-

saralda y UNPX15 de Llano Bajo, Valle del Cauca con una concentración de  $10^4$  cel/ml, sugiriendo que estos aislamientos son altamente virulentos.

Las UFC en tiempo y entre aislamientos fueron significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ), como se observa en la figura 3, debido a que no todas las especies desarrollan los mismos factores de virulencia (toxinas) para evadir el sistema inmune del insecto hospedero.

En general el aumento de UFC se observa entre las 12 y 24 h después de la inoculación como lo describe



**Figura 2.** Mortalidad de larvas de último instar de *G. mellonella* inoculadas con los aislamientos bacteriales en tres tiempos diferentes.

**Tabla 2.** Características de identificación bioquímica de los aislamientos de *Xenorhabdus* spp.

Aislamiento	Motilidad	Lipasa	Lecitinasa	Proteasa	Abs. BTB	Abs. RN	Biolumi.	A/B (mm)
UNPX01	+	+	+	+	+	+	-	35
UNPX02	+	+	+	+	+	+	-	40
UNPX03	+	+	+	+	+	+	-	35
UNPX04	+	+	+	+	+	+	-	20
UNPX06	+	+	+	+	+	+	-	30
UNPX07	+	+	+	+	+	+	-	30
UNPX08	+	+	+	+	+	+	-	25
UNPX09	+	+	+	+	+	+	-	20
UNPX10	+	+	+	+	+	+	-	30
UNPX11	+	+	+	+	+	+	-	>40
UNPX12	+	+	+	+	+	+	-	15
UNPX13	+	+	+	+	+	+	-	35
UNPX15	+	+	+	+	+	+	-	25

Abs. BTB: absorción del azul de bromotimol, Abs.RN: absorción del rojo neutro. A/B: diámetro del halo de inhibición frente a *B. thuringiensis*.

**Tabla 3.** Media de Porcentaje de mortalidad (Pmor) en larvas de *G. mellonella*, inoculadas con *Xenorhabdus* sp.

PMOR cepa	12 horas Media	24 horas Media	48 horas Media	Media General	Error Estándar	Grupo Homogéneo
UNPX04	80.00	100.00	100.00	93.33	9.7	a
UNPX15	53.33	100.00	100.00	84.44	10.1	b
UNPX01	4.17	93.33	100.00	65.83	10.5	c
UNPX06	0.00	93.33	100.00	64.44	10.9	c
UNPX03	0.00	91.67	96.67	62.78	10.1	cd
UNPX10	0.00	90.00	93.33	61.11	10.1	cd
UNPX09	0.00	73.33	93.33	55.56	10.1	d
UNPX08	0.00	54.17	100.00	51.39	10.5	e
UNPX12	0.00	16.67	100.00	38.89	9.7	fg
UNPX07	0.00	33.33	80.00	37.78	9.7	fg
UNPX02	0.00	0.00	91.67	30.56	10.9	gh
UNPX11	0.00	0.00	90.00	30.00	9.7	h
UNPX13	0.00	10.00	16.67	8.89	9.7	i
CONTROL	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0	

Medias con las mismas letras no son significativamente diferentes al nivel del 5%, según la prueba de Duncan.

Sicard *et al.* (2004). El crecimiento exponencial retrasado de los aislamientos posiblemente se deba a que las bacterias quedan atrapadas en los hemocitos, donde se multiplican lo suficiente para después pasar al hemocele

Se encontraron diferencias entre los aislamientos así: en los aislamientos UNPX01, UNPX04, UNPX06, UNPX09, UNPX10, UNPX12 y UNPX15 la septicemia se produjo antes de la muerte de las larvas, mientras que en los aislamientos UNPX02, UNPX03, UNPX07, UNPX08, UNPX12, y UNPX13 la mortalidad de la larva ocurrió cuando el crecimiento bacteriano se encontraba en el pico de la fase estacionaria, como lo mencionan Clarke y Dowds (1995).

El mayor porcentaje de mortalidad de *G. mellonella* inoculada con los aislamientos bacterianos se observa a las 48h, debido a que la mayoría de aislamientos empezaron a morir a partir de las 24h (figura 2).

La identificación molecular de las especies bacterianas, hace parte de la continuación de este trabajo (dato no publicado).

## Conclusiones

De 13 aislamientos de neps, se aislaron y caracterizaron bacterias del género *Xenorhabdus* en fase I. Las diferencias significativas encontradas entre los aislamientos en las pruebas de porcentaje de mortalidad y

UFC hacen suponer que los aislamientos pertenecen a diferentes especies, o entre la misma especie existe variabilidad genética. El porcentaje de mortalidad, no siempre es directamente proporcional al número de bacterias presentes en la larva, pues pueden encontrarse ciertas especies donde un bajo número de bacterias puede causar la muerte de los insectos. Siendo estos aislamientos más virulentos, que los aislamientos bacterianos que necesitan una mayor población para causar septicemia. Los resultados obtenidos permiten considerar las bacterias simbiotes de neps como alternativa viable para el manejo integrado de insectos plaga y su uso en el desarrollo de producción masiva de Neps tanto en medio sólido como *in vitro*.

## Referencias bibliográficas

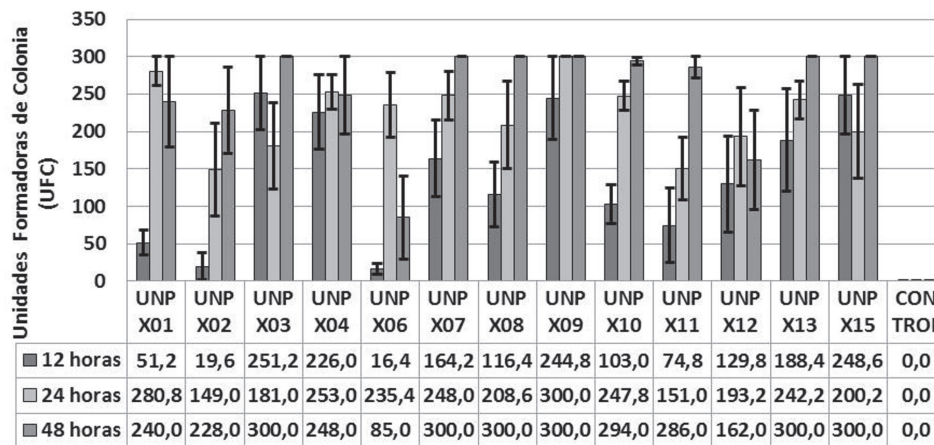
- Adams BJ., Fodor A., Koppenhöfer HS., Stackebrandt E., Stock SP., Klein MG. 2006. Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. *Biological Control*. 38:4-21.
- Arkhurst R. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. *Journal of genetic Microbiology*. 121: 303-309.
- Akhurst R. 1982. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*. *Journal of genetic Microbiology*. 128: 3061-3065.
- Akhurst R., Boemare N. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL. Gaugler, R., Kaya H. 75-90.



**Tabla 4.** Media de UFC en larvas de *G. mellonella*, inoculadas con los aislamientos de *Xenorhabdus* sp.

UFC cepa	12 horas Media	24 horas Media	48 horas Media	Media General	Error Estándar	Grupo Homogéneo
UNPX06	16.4	235.4	85.0	112.3	28.5	a
UNPX12	129.8	193.2	162.0	161.7	25.5	b
UNPX11	74.8	151.0	286.0	170.6	25.5	bc
UNPX02	19.6	149.0	228.0	132.2	28.5	bc
UNPX08	116.4	208.6	300.0	208.3	27.4	bc
UNPX01	51.2	280.8	240.0	190.7	27.4	bcd
UNPX10	103.0	247.8	294.0	214.9	26.4	bcd
UNPX07	164.2	248.0	300.0	237.4	25.5	cd
UNPX04	226.0	253.0	248.0	242.3	25.5	cd
UNPX13	188.4	242.2	300.0	243.5	25.5	cd
UNPX03	251.2	181.0	300.0	244.1	26.4	d
UNPX15	248.6	200.2	300.0	249.6	26.4	d
UNPX09	244.8	300.0	300.0	281.6	26.4	d
Control	0.0	0.0	0.0			

Medias con las mismas letras no son significativamente diferentes al nivel del 5%, según la prueba de Duncan. Los resultados de UFC, se expresan en unidades de  $10^4$ .



**Figura 3.** Unidades formadoras de colonias bacteriales en los tres tiempos.

Akhurst R, Boemare N. 2005. Genus XL. *Xenorhabdus*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (The Proteobacteria), Part B (The Gammaproteobacteria). New York. In: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Garrity, G.M. Springer. 2: 831-838.

Akhurst R., Dunphy G. 1993. Tripartite interaction between symbiotically associated entomopathogenic bacteria, nematodes and their insect hosts. *Parasites and Pathogen of Insects*. 2: 1-23.

Boemare N., Akurst R. 1988. Biochemical and Physiological Characterization of Colony form Variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). *International Journal of Systematic Bacteriology*. 134: 751-761.

Boemare N., Givaudan A., Brehelin M., Laumond C. 1997. Symbiosis and pathogenicity of nematode bacterium complexes. *Symbiosis*. 22: 21-45.

Bowen D., Ensign J. 1998. Purification and characterization of a high-molecular-weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 3029-3035.

Burnell A., Stock S. 2000. Symposium *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts -lethal pathogens of insects. *Nematology*. 2(1): 31-42.

Chaston JM., Suen G., Tucker SL., Andersen AW., Bhasin A. 2011. The Entomopathogenic Bacterial Endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: Convergent Lifestyles from Divergent Genomes. *PLoS ONE*. 6(11): e27909. doi:10.1371/journal.pone.0027909

Campos R., Tailliez P., Pages S., Ginibre N., Gutierrez C., Boemare N. 2009. Characterization of *Xenorhabdus* isolates from La Rioja

- (Northern Spain) and virulence with and without their symbiotic entomopathogenic nematodes (Nematoda: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 102(2): 173-181.
- Clarke D., Dowds B. 1995. Virulence mechanisms of *Photorhabdus* sp. Strain K122 toward wax moth larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. 66: 149-155.
- Dudney R. 1997. Use of *Xenorhabdus nematophilus* m/l and 1906/1 for Fire Ant Control. *US Patent Application* 5616 318.
- Elawad S., Gowen S., Hague N. 1999. Efficacy of bacterial symbionts from entomopathogenic nematodes against the beet army worm (*Spodoptera exigua*). Test of Agrochemicals and Cultivars No. 20. *Annals of Applied Biology*. 134: 66-67.
- Ensign J., Bowen D., Tenor J., Ciche T., Petell J., Strickland J., Orr G., Fatig R., Bintrim S., Ffrench-Constant R. 2002. Proteins from the genus *Xenorhabdus* are toxic to insects on oral exposure. *US Patent Application*. 20020147148.
- Ffrench-Constant R., Bowen D. 1999. *Photorhabdus* toxins: novel biological insecticides. *Current Opinion in Microbiology*. 2: 284-288.
- Forts S., Nelson K. 1996. Molecular Biology of the Symbiotic-Pathogenic Bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *Microbiological Reviews*. 60( 1): 21-43.
- Gerritsen L., De Raay G., Smit P. 1992. Characterization of form variants of *Xenorhabdus luminescens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(6): 1975-1979.
- Gotz P., Boman A., Boman H. 1981. Interactions between insect immunity and insect pathogenic nematode with symbiotic bacteria. *Proceedings of the Royal Society of London*. 212: 333-350.
- Hazir S., Kaya H., Stock P., Keskün N. 2003. Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for Biological Control of Soil Pests. *Turkish Journal of Biology*. 27: 181-202.
- Hinchliffe SJ., Hares MC., Dowling AJ. and Ffrench-Constant RH. 2010. Insecticidal Toxins from the *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* Bacteria *The Open Toxicology Journal*, 3: 101-118.
- Kaya H., Stock S. 1997. Manual of techniques in insect pathology. Biological techniques. Academic Press, Inc. San Diego. En: Lacey, L. A. 281-324.
- Mahar AN., Munir M., Elawad S., Gowen S R., Hague N G. 2004. Microbial control of diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) using bacteria (*Xenorhabdus nematophila*) and its metabolites from the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *J Zhejiang Univ. SCL*. 5(10):1183-1190.
- Mahar A., Munir M., Gowen S., Hague N. 2005. Role of entomopathogenic bacteria, *Photorhabdus luminescens* and its toxic secretions against *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Entomology*. 2: 69-76.
- Sicard M., Brugirard-Ricaud K., Pagès S., Lanois A., Boemare N., Brehélin M., Givaudan A. 2004. Stage of infection during the tripartite interaction between *Xenorhabdus nematophila*, its nematode vector and the insect hosts. *Application Environmental Microbiology*. 70: 6473-6480.
- Thomas G., Poinar G. 1979. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic and nematophilic bacteria of the family *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 29:352-360.
- Webster J., Chen G., Li J. 1998. Parasitic worms. An ally in the war against the superbugs. *Parasite Today*. 14: 161-163.
- Yi X., Ehlers R. 2006. Combining *Steinernemacarpocapsae* and *Bacillus thuringiensis* strains for control of diamondback moth (*Plutellaxylostella*). *Communications in agricultural and applied biological sciences*. 71(3):633-6.

# Estudio de libertad de operación para una línea genéticamente modificada de papa (*Solanum tuberosum* L.)

## Study of freedom to operate for a genetically modified potato (*Solanum tuberosum* L.) line

Viviana Patricia Hincapié Rojas\*, Alejandro Chaparro-Giraldo\*\*

### Resumen

Durante el desarrollo de los productos biotecnológicos son utilizados materiales y procesos, que pueden estar protegidos por derechos de propiedad intelectual. Para evitar problemas legales en su comercialización, se deben realizar estudios de libertad de operación. Este estudio se realizó sobre una línea genéticamente modificada (GM) de papa (*Solanum tuberosum* L.) derivada de la variedad Pastusa Suprema, que expresa el gene Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*, desarrollada por la Corporación de Ciencias Biológicas y la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. El punto de partida, fue la deconstrucción del producto, cuyo resultado fue la lista de materiales y procesos usados en el desarrollo del producto. Se buscaron en bases de datos nacionales e internacionales de acceso público, las solicitudes de patentes y patentes relacionadas. En el nivel internacional, se encontraron cuatro solicitudes de patentes y dieciocho patentes relacionadas, la mayoría de las cuales, no han sido solicitadas en Colombia. En el nivel nacional, se encontraron 13 solicitudes de patentes, que han caducado, han sido negadas, abandonadas, desistidas, o están en requerimiento. Se encontró que la variedad tiene registro comercial, pero no título de obtentor. También se examinaron documentos de las instituciones participantes, que contuvieran cláusulas sobre propiedad intelectual, y otros documentos de interés, como los acuerdos de transferencia de materiales (ATM). Se concluye que la libertad de operación puede estar afectada más por problemas detectados en los ATM y en la complejidad de los acuerdos interinstitucionales suscritos, que por los derechos de propiedad intelectual.

**Palabras clave:** Derechos de propiedad intelectual, biotecnología, cultivos transgénicos.

### Abstract

During the development of biotechnological products, some materials and processes are used, which can be protected by intellectual property rights (IPR's). In order to avoid legal problems related to their marketing, freedom-to-operate studies need to be done. This study was made on a genetically modified (GM) potato (*Solanum tuberosum* L.) derived from variety "Pastusa Suprema", which expresses the gene cry1Ac from *Bacillus thuringiensis*, developed by Corporation for Biological Research (Corporación para Investigaciones Biológicas - CIB) and National University of Colombia at Medellín (Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín). The starting point was the deconstruction of the product, whose result was the list of materials and processes used in the development of the new product. Patents and related applications were searched in national and international databases. At the international level, four applications and eighteen patents were found, most of which have not been applied for in Colombia. At the national level, thirteen applications were found, which have expired, have been denied, abandoned, desisted or are currently on request. The plant variety has commercial registration but not breeder's certificate. Documents of the partaker institutions with IP clauses and other documents of interest, such as Material Transfer Agreements (ATM), were examined. It can be concluded that the freedom to operate might be affected for issues related to the ATMs and to the complexity of inter-institutional agreements, rather than for intellectual property rights.

**Key words:** Intellectual property rights, biotechnology, transgenic crops.

**Recibido:** septiembre 18 de 2013      **Aprobado:** mayo 2 de 2014

\* Licenciada en Bióloga, MSc. Biociencias y Derecho, Grupo de Ingeniería Genética de Plantas, Departamento de Biología & Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. E-mail: vphincapier@unal.edu.co

\*\* I. Agrónomo, MSc., PhD. Grupo de Ingeniería Genética de Plantas, Departamento de Biología & Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. E-mail: acahparrog@unal.edu.co

## Introducción

Maíz, algodón, colza y soya son los principales cultivos en los que se está aplicando la tecnología transgénica o de modificación genética (GM) en el mundo. En 2012, se sembraron en un área global de 170,3 millones de hectáreas (James, 2012). En Colombia, el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), la Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá y Sede Medellín), la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), el Centro Nacional de Investigaciones del Café (CENICAFE), el Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (CENICAÑA), y la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), adelantan estudios para aplicar la tecnología GM a cultivos locales como yuca, frijol, arroz, caña, café, papa y algodón (AGROBIO, 2012). Las actividades con organismos vivos modificados para uso agrícola se reglamentan por el decreto 4525 de 2005, que determina que el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) es la autoridad nacional competente en el tema, y es asesorada por un comité nacional de bioseguridad en el que participan además, el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, el Ministerio de Salud y Protección Social, y el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS).

La acumulación de derechos de propiedad intelectual, sobre innovaciones biotecnológicas, puede llegar a restringir la comercialización de un producto. Esto genera varios efectos negativos: a) perder las posibilidades de uso comercial de la investigación, b) demandas por infringir derechos de terceros, c) sanciones por incumplimientos de la reglamentación existente, d) demoras en la salida al mercado del producto, por la falta de acuerdos de distribución de beneficios entre las instituciones participantes (Kimpel, 1999; Binenbaum, et al., 2003; Yancey y Stewart, 2007).

La libertad de operación es la búsqueda de información tecnológica no asociada a derechos de propiedad intelectual y la identificación de patentes o solicitudes en trámite, que cubren los materiales y procesos usados en el producto en sí mismo, o en su desarrollo, y que aún se encuentran en vigor. La búsqueda se realiza sobre las reivindicaciones de las patentes concedidas o las solicitudes publicadas, para definir el grado de libertad que tiene la innovación para ser comercializada (Ortiz et al., 2010). Se trata de identificar patentes relevantes no vencidas o solicitudes en trámite, que podrían convertirse en obstáculos de comercialización en los países seleccionados para la fabricación, venta o uso de la innovación. Los estudios de libertad de operación proporcionan evaluaciones de los riesgos en materia de violación de patentes concedidas, y de la posible infracción de las solicitudes de patentes pendientes. Un buen análisis de libertad de operación, en el contexto del desarrollo de cultivos GM, reduce el riesgo de infringir una patente o un título de obtentor

vigente y evita futuros litigios (Kowalski, 2002; Wolff, 2008).

Para el análisis de la libertad de operación, debe tenerse en cuenta que: a) no existen patentes internacionales, todas son concedidas para un jurisdicción determinada; b) las leyes acerca de lo que es patentable varían entre países; c) las patentes caducan por tiempo de vencimiento o por no pago de derechos; d) existen excepciones y limitaciones para determinados usos de las patentes; e) patentes emitidas en diferentes países pueden tener diferentes rango de reivindicaciones (BIOS, 2009). Una patente también puede ser utilizada cuando se otorga una licencia obligatoria a un país miembro después de presentar una declaración de la existencia de razones de interés público, de emergencia, o de seguridad nacional, sólo mientras estas razones permanezcan, siempre y cuando ya se haya intentado negociar la licencia y no se haya tenido respuesta positiva.

Estudios realizados por (Kryder et al., 2000; Brewster et al., 2007; Boadi y Bokanga, 2007; Chi-Ham, 2010) concluyen que el realizar estudio de libertad de operación desde el inicio de la investigación, permite buscar licencias o acuerdos formales y plantear estrategias para que el producto pueda ser comercializado posteriormente, sin infringir derechos de terceros. Estas estrategias, pueden ser: re-diseñar las construcciones genéticas, cuando estas son la base de la innovación; establecer licencias libre 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. Las entidades que hagan investigación con fines comerciales, precisan analizar y rastrear los diferentes derechos de propiedad intelectual, revisar la reglamentación vigente y la documentación completa del proyecto, antes, durante y después de desarrollar la investigación.

Un elemento importante en el análisis de las patentes, son las reivindicaciones. El alcance de la protección y los derechos sobre lo que el titular quiere proteger su innovación está delimitado en las reivindicaciones. Las reivindicaciones están enumeradas en orden ascendente especificando en la primera las características del producto o procedimiento. Pueden “ser independientes o dependientes. Una reivindicación será independiente cuando defina la materia que se desea proteger sin referencia a otra reivindicación anterior. Una reivindicación será dependiente cuando defina la materia que se desea proteger refiriéndose a una reivindicación anterior. Una reivindicación que se refiera a dos o más reivindicaciones anteriores se considerará una reivindicación dependiente múltiple” (artículo 30 Decisión 486 de 2000 CAN).

La investigación para el desarrollo de líneas GM de papa, se vienen adelantando desde 1996. A lo largo de estos años varios estudios se hicieron bajo conve-



nios o acuerdos con CORPOICA, el Centro Virtual de Investigación de la Cadena Agroalimentaria de la Papa (CEVIPAPA), la Federación Colombiana de Productores de Papa (FEDEPAPA), Secretaria de Agricultura de Antioquia, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), y el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, los cuales fueron tramitados ante el ICA, como autoridad nacional competente en la materia (Rodríguez, *et al.*, 2000; Trujillo, *et al.*, 2001; Valderrama, *et al.*, 2007; Torres, 2010).

### **Materiales y métodos**

El estudio de libertad de operación se hace sobre una línea GM de papa (*Solanum tuberosum* L.), derivada de la variedad Pastusa Suprema, que expresa el gene *cry1Ac* originario de *Bacillus thuringiensis*, desarrollada en convenio entre la Corporación de Investigaciones Biológicas (CIB) y la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín (UNCSM). Este material ha probado ser altamente resistente al ataque de *Tecia solanivora*, la principal plaga en Colombia del cultivo de la papa (Valderrama *et al.*, 2007).

### **Deconstrucción del producto**

Cuando la investigación ya se encuentre en progreso, el producto se descompone en los materiales y protocolos que fueron utilizados para su desarrollo, y se establece el espacio geográfico donde se planeó liberarlo comercialmente (Chaparro-Giraldo, *et al.*, 2009). En el caso de líneas GM producidas por ingeniería genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* se identifican los siguientes materiales biológicos: casetes de expresión (región promotora, región secuenciadora, región terminadora) del gene de interés, casetes de expresión del gen marcador de selección, vectores de clonación, vectores de transformación, cepas bacterianas, especie vegetal, y genotipo. Los protocolos más comúnmente usados, son: cultivo de tejidos vegetales, transformación genética de bacterias, transformación genética de plantas, caracterización molecular de bacterias, caracterización molecular de plantas.

La información fue obtenida de los cuadernos de los laboratorios, las tesis de maestría y las publicaciones científicas de los investigadores participantes en la investigación.

### **Revisión y análisis de derechos de propiedad intelectual**

En el estudio se realizó la búsqueda en las siguientes bases de datos internacionales de acceso público: "Patent Lens" (<http://www.PatentLens.net>) que es una iniciativa de CAMBIA (<http://www.cambia.org>), Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos (USPTO, <http://www.uspto.gov/patft>), Google (<http://www.google.com/patents>), Oficina Europea de Patentes (es-

pacenet, <http://espacenet.com>), Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (patentscope, <http://www.wipo.int/patentscope>). La búsqueda se hizo tecleando el elemento en el campo "claims".

Para la búsqueda nacional se utilizó la base de datos de la Superintendencia de Industria y Comercio (SIC) (<http://www.sic.gov.co>). La búsqueda se hizo en el campo de propietario o solicitante, con base en el nombre de los solicitantes encontrados en las bases de datos internacionales. Para hacer la revisión de las patentes que se encontraban en publicación o requerimiento se consultó en el servicio de documentación e información de la SIC.

Otro derecho de propiedad intelectual que se debe tener en cuenta, en las investigaciones con los cultivos GM, son los títulos de obtentor que puedan existir sobre la variedad utilizada.

### **Análisis de documentación adicional**

Se revisaron documentos que puedan contener cláusulas relacionadas con propiedad intelectual, tales como: normatividad interna de la institución donde se desarrolla la investigación, acuerdos de transferencia de material, acuerdos de confidencialidad, contratos de cooperación y financiación, convenios interinstitucionales, contratos laborales, y contratos de cesión de derechos, entre otros. Como el escenario es nacional, en el caso de Colombia, se analizó si el proyecto precisa de contrato de acceso a recursos genéticos, según la decisión 391 de 1996 de la Comunidad Andina. La información colectada de estos documentos se recopiló, teniendo en cuenta el tipo de documento, el nombre de las instituciones o personas que intervienen, la fecha de expedición, el contenido, las condiciones y las cláusulas relacionadas con propiedad intelectual.

### **Resultados y discusión**

En el estudio de libertad de operación de cultivos GM, es necesario realizar un análisis detallado de la revisión de la documentación involucrada en la investigación. Es así como se tiene en cuenta, las características propias del evento, los documentos relacionados con derechos de propiedad intelectual que puedan estar involucrados en la investigación (patentes, solicitudes en trámite y títulos de obtentor), y la normatividad relacionada con cláusulas de propiedad intelectual propias de las instituciones que desarrollan la investigación.

### **Deconstrucción del producto**

Para hacer la deconstrucción se partió del producto terminado, líneas GM derivadas de la variedad Pastusa suprema, que expresan el gene *cry1Ac*, desarrolladas por ingeniería genética basada en *Agrobacterium tumefaciens*. La información se obtuvo de la revisión de los cuadernos de laboratorio, la tesis de grado de

Torres (2010) y los artículos de Trujillo *et al.* (2001), resultando la siguiente lista de elementos y procesos:

- Genotipo: Variedad Pastusa Suprema.
- Cepas bacterianas: LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*.
- Vector de transformación: pCAMBIA 1305.1, usando los siguientes plásmidos intermediarios pBI526, p1Ac526 y p1AcPRD.
- Casete de expresión gen Cry1Ac: p (promotor) 35s 2x – cry1Ac – t (terminador) NOS.
- Casete de expresión gen marcador de selección: pNOS – nptII – tNOS.
- Cultivo de tejidos vegetales: protocolo de regeneración para Pastusa Suprema (*Solanum tuberosum* L.).
- Protocolo de transformación de plantas: *Agrobacterium tumefaciens* para *Solanum tuberosum* sb. Andigena.
- Protocolos de transformación de bacterias: *Agrobacterium tumefaciens*

Con relación a la geografía de patentes, este producto se planea aplicarlo comercialmente, en el territorio de la república de Colombia.

Con relación a la legislación de bioseguridad, en Colombia para los organismos vivos modificados, se aplica el decreto 4525 de 2005, que reglamenta la ley 740 de 2002.

El alcance de la protección y los derechos sobre lo que el titular quiere proteger su innovación, mediante el uso de patentes, está delimitado por las reivindicaciones. Sólo la tecnología incluida en las reivindicaciones está protegida. Si un solicitante o su agente no redacta correctamente las reivindicaciones, cualquier aspecto o elemento de la invención incluido en la descripción detallada y que no esté incluido en ellas, pasa a ser parte del estado de la técnica una vez publicada la patente. Es decir que cualquier persona podrá utilizar, sin la autorización del titular de la patente toda la información no protegida, y el titular de la patente no podrá hacer nada al respecto (Hong, 2013).

Las patentes que se listan en la tabla 1 fueron encontradas en las bases de datos internacionales. En ella se presentan las patentes que protegen los materiales y procesos utilizados en el desarrollo de la línea GM.

No se encontraron patentes vigentes o solicitudes de patentes sobre el vector de transformación, o los plásmidos intermediarios usados en su construcción, en las bases de datos usadas, y en el periodo pesquisado.

Se encontraron 18 patentes y 4 solicitudes en trámite, relacionadas con los materiales y procesos hallados en la deconstrucción del producto. Algunas patentes ya caducaron como EP0451878B1 y EP0451878B2, referentes al promotor pNOS, y EP 0520962 B1 referentes al gene nptII, patentes vencidas en 2006 y 2012. Las fechas de vencimiento de las patentes activas están entre 2017 y 2030. Con relación a las empresas y entidades propietarias de las patentes o responsables de la solicitud de patentes, es notoria la participación de las corporaciones multinacionales biotecnológicas o aparecen nombres de empresas que han sido adquiridas por ellas. Por ejemplo, Athenix Corporation y Plant Genetic System, fueron compradas por Bayer CropScience (4 patentes en la lista); Calgene, fue obtenida por Monsanto (3 patentes en la lista); Pioneer Hi Bred fue tomada por Dupont (2 patentes en la lista). Otros actores importantes son las universidades públicas norteamericanas: University of California, University of Minnesota, University of Illinois y Michigan State University.

Puesto que los derechos de propiedad intelectual son territoriales, se debe realizar el análisis de las patentes en los países o regiones donde se quiere comercializar el producto. En este caso, la comercialización se va a hacer en el territorio de la república de Colombia. Por ello, se procedió a realizar la búsqueda en la base de datos nacional (SIC), con el resultado de que la mayoría de patentes detectadas en la búsqueda internacional, no fueron solicitadas en el país (ver tabla 2).

La mayoría de las 13 solicitudes de patentes tramitadas en Colombia, relacionadas con la línea transgénica en estudio, presentan a la fecha, estado de desistimiento, abandono, negación o han caducado. Existen cuatro solicitudes en requerimiento, de las cuales al realizar la revisión de las reivindicaciones, a pesar que están relacionadas con el objeto de estudio en el análisis literal de las reivindicaciones, se determinó que no estarían influyendo en el desarrollo de la innovación. La referencia de estas últimas como “requerimiento 45” se refiere a cuando en el estudio de fondo de la solicitud, se requiere de mayor información por parte del solicitante, cuando no cumple con alguno de los requisitos establecidos para la concesión de la patente. Cuenta para dar respuesta 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).

Las entidades que están haciendo solicitudes de patentes en relación con la línea GM estudiada en Colombia, son las corporaciones multinacionales, dominantes en el sector de la biotecnología vegetal: Monsanto (5 solicitudes); Bayer CropScience por medio de Athenix Corporation (1 solicitud); Dupont a través de Pioneer Hi Bred (1 solicitud); Syngenta (1 solicitud); Novartis (1 solicitud).

Se recomienda mantener actualizada la revisión de las solicitudes de las patentes, para que sean hechos los ajustes, acorde con la reglamentación vigente y

**Tabla 1.** Patentes relacionadas con la línea GM de papa que expresa el gene cry1Ac, publicadas en las bases de datos internacionales consultadas.

Elemento	Número de publicación / solicitud	Título	Solicitante	Fecha de prioridad	Fecha de vencimiento estimada
Transformación de papa	US 6541682	Plastid transformation of solanaceous plants	Calgene LLC	12/11/ 1998	12/11/2018
Cry1Ac	WO2009049126A2	Synthetic Genes Encoding Cry1Ac	Athenix Corporation	10/10/2007	10/10/ 2027
Cry1Ac	US 8173872	<i>Bacillus thuringiensis</i> insecticidal proteins	Bayer CropScience NV	23/09/2010	23/09/2030
Cry1Ac	US 7435874	Plant resistance gene	Christiane Gebhardt y otros	30/08/2002	30/08/2022
Cry1Ac	US 5959176	Plant promoter and utilization thereof	Sumitomo Chemical Company, Limited	12/081997	12/08/2017
Cry1Ac	US 5962264	Method of reducing the proteolytic degradation of <i>Bacillus thuringiensis</i> insecticidal toxic protein	Monsanto Company	29/05/1998	29/05/2018
Cry1Ac	US8344207	Nucleotide sequences encoding insecticidal proteins	Monsanto Technology LLC	31/08/2005	31/08/2025
p35s 2x	WO2012058762A1	Plant expression system	Medicago INC.	4/11/2010	4/11/2030
tNOS	US 7629502	Non-antibiotic selection marker genes	Academia Sinica, Nan-Kang	7/12/2006	7/12/2026
pNOS	EP 0451878 B2	Modifying plants by genetic engineering to combat or control insects	Bayer BioScience N.V.	18/01/1985	18/01/2005
pNOS	EP 0451878 B1	Modifying plants by genetic engineering to combat or control insects	Plant Genetic Systems	1701/1986	17/01/2006
npTII	EP 0520962 B1	Plasmid vectors for gene expression in plants	Ente per le nuove tecnologie, l'energia e l'ambiente	24/06/1992	14/06/2012
npTII	EP0927765 A1	Method for selecting transformed cells	Japan Tobacco Inc.	7/07/1999	7/07/2019
npTII	US 6100456	Lepidopteran Insect Resistant Transgenic Potato	Board of Trustees operating Michigan State University	16/08/1992	16/08/2012
Cultivo de tejidos	US 5965727	For selectable markers and promoters for plant tissue culture transformation	Board of Trustees of the University of Illinois	31/12/1997	31/12/2017
Vector Binario y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AU 764100 B2	Method of plant transformation	Pioneer Hi-Bred International	28/09/1999	28/09/2019
Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	US 6323396	Agrobacterium-mediated transformation of plants	Nunhems Zaden BV	24/02/2000	24/02/2020
Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	US 6759573	Method to enhance agrobacterium-mediated transformation of plants	Regents of the University of Minnesota	15/12/ 2000	15/12/2020
LBA4404	US 8334429	Auxotrophic Agrobacterium for plant transformation and methods thereof	Pioneer Hi Bred International Inc	30/12/2009	30/12/2029
Inducción de callos	US 6235529	Compositions and methods for plant transformation and regeneration	The Regents of the University of California	29/04/1997	29/04/2017
Inducción de callos	US 6284956	Plant selectable marker and plant transformation method	Applied Phytologics, Inc	25/06/1999	25/06/2019
Inducción de callos	US8481319B2	Composition and Method for Modulating Plant Transformation	Igor KOVALCHUK; Alex Boyko	23/06/2009	23/06/2029

con el seguimiento correspondiente a las protecciones que se aprueben posteriores a enero de 2013. Esto debe realizarse antes de la comercialización del producto, procurando la mayor cercanía entre estas dos fechas, teniendo en cuenta además que: a) en la Superintendencia de Industria y Comercio se encuentran dando respuesta a las solicitudes radicadas desde el 2008, b) una solicitud tramitada por el Tratado de Cooperación en materia de Patentes (2001) tiene treinta meses para entrar en las fase nacional, c) existe un “periodo de silencio” cuando se inicia la solicitud.

Con relación a la variedad Pastusa Suprema se encuentra el Registro Nacional de Cultivares Comerciales (resolución del ICA 2076 de 2006), pero sin título de obtentor.

#### **Análisis de documentación adicional**

Los acuerdos de transferencia de material (ATM), de entendimiento, de financiamiento, de alianzas, etc., deben contener las cláusulas sobre condiciones de distribución económica, y titularidad del producto. Se deben “señalar explícitamente todo lo relacionado con algún tipo de propiedad intelectual previa; es de-

cir, propiedad intelectual obtenida por alguno de los miembros antes de iniciarse la ejecución de la investigación, y señalar de igual manera que el investigador deja disponible la propiedad intelectual, libre de regalías, para la conducción de las actividades del proyecto” (Salazar y Silva, 2010).

En la tabla 3 se resume la información sobre los documentos considerados relevantes para el análisis de

libertad de operación de la línea GM derivada de la variedad Pastusa Suprema.

A continuación se presentan condiciones específicas, de algunos documentos mencionados en la tabla anterior.

El acuerdo de confidencialidad tiene las siguientes condiciones: a) guardar absoluta reserva de toda la información relativa a toda la información a los procedimientos y procesos técnico o científicos que se

**Tabla 2.** Solicitudes de patentes relacionadas con la línea GM de papa que expresa el gene cry1Ac, publicadas en la base nacional de patentes de la SIC.

No. Solicitud	Fecha solicitud	Solicitante	Título	Estado SIC	Fecha del estado	Actos administrativos
10 157.545	15/12/2010	Athenix Corporation	Genes de toxinas y métodos para su uso	Requerimiento 45	16/01/2013	Oficio 2226 de 10/02/2011 Oficio 231 de 16/01/2013
10 128.683	15/10/2010	Consejo Superior de Investigaciones Científicas	Sistema para la expresión de péptidos sobre la superficie bacteriana de <i>Escherichia coli</i>	Requerimiento 45	17/01/2013	Oficio 15761 de 02/12/2010 Oficio 474 de 17/01/2013
08 019.688	26/02/2008	Monsanto Technology, LLC	Secuencias de nucleótidos que codifican proteínas insecticidas.	Requerimiento 45	17/01/2013	Oficio 6268 de 15/05/2008 Oficio 12463 de 17/07/2012 Oficio 384 de 17/01/2013
08 019.691	26/02/2008	Monsanto Technology, LLC	Composiciones insecticidas y métodos para crear plantas transgénicas resistentes a insectos	Abandono	23/03/2010	Oficio 6269 de 15/05/2008; Resolución 15628 de 23/03/2010
08 027.244	14/03/2008	Monsanto Technology, LLC	Métodos y composiciones para el control genético de infestaciones de insectos en plantas.	Requerimiento 45	17/01/2013	Oficio 6732 de 22/05/2008 Oficio 12466 de 17/07/2012 Oficio 383 de 17/01/2013
06 101.066	06/10/2006	Monsanto Technology, LLC	Composiciones insecticidas y métodos para el control de infestaciones de insectos en plantas	Negación	24/08/2012	Oficio 13898 de 30/11/2006; Oficio 14784 de 11/11/2010; Oficio 8918 de 02/06/2011 Oficio 4096 de 13/03/2012 Resolución 49987 de 24/08/2012
06 101.616	09/10/2006	Syngenta Limited	Secuencias reguladoras para expresar productos de gen en un tejido reproductor de plantas	Abandono	19/09/2008	Oficio 13902 de 30/11/2006, Resolución 35025 de 19/09/2008
06 001.259	06/01/2006	Monsanto Technology, LLC	Proteínas insecticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i> y usos de la misma	Negación	23/12/2010	Oficio 6526 de 15/06/2006; Oficio 6451 de 13/05/2010; Oficio 6452 de 13/05/2010; Resolución 71967 de 23/12/2010
6 84256	25/08/2006	Pioneer Hi-Bred International Inc	Nuevos polipéptidos cristalinos y polinucleótidos de <i>Bacillus thuringiensis</i> y composiciones con los mismos.	Negación	17/04/2012	Oficio 13560 de 23/11/2006; Oficio 19 de 04/01/2012 Resolución 21896 de 17/04/2012
	20/04/1998	Syngenta Mogen B.V.	Método para la selección de plantas transformadas	Caducado	26/12/2007	Resolución 3201 de 31/01/2002 Resolución 44199 de 26/12/2007
35569		Commonwealth Scientific & Industrial Research Organisation	Agente de control biológico para insectos	Desistimiento	15/02/1999	Resolución 2140 de 16/02/1999
	15/09/1995	Novartis AG	Composiciones que contienen proteínas pesticidas, cepas de <i>bacillus</i> , proteínas y genes que codifican a las proteínas de <i>bacillus</i>	Caducado	16/04/2010	Resolución 40694 de 30/11/20 Resolución 7939 de 15/03/2002 Resolución 19594 de 16/04/2010
	18/07/2000	John Innes Centre	Método de transformación y plantas transgénicas producidas por este	Abandono	19/02/2003	



utilizan en el desarrollo de la investigación; b) no utilizar ni divulgar la información para fines distintos a los previstos por el estudio; c) todos los documentos empleados y la información le pertenecen a la CIB, con excepción de la información que el investigador conozca antes de la firma del acuerdo y la información que llegará a ponerse en dominio público. Estos acuerdos son firmados por todos los investigadores (Salazar y Silva, 2010).

El acuerdo de transferencia de material, con el que se recibió el casete de expresión del gene cry1Ac de la Universidad de Ottawa, contiene las siguientes condiciones: a) uso exclusivo para investigación; b) prohibición de comercializar o negociar con una tercera seres humanos; d) “el beneficiario se compromete a utilizar el material sólo como parte de un plan de investigación acordado entre los científicos beneficiarios participantes y la institución”.

Derivado del análisis del ATM, se detectan dos problemas. El primero es que la variedad Pastusa Suprema usada en el desarrollo de la innovación, no está incluida. El segundo es que es específico para investigación científica. Como estrategia se requiere, solicitar la inclusión de la variedad y negociar el uso comercial de los genes recibidos.

La norma de propiedad intelectual que rige en la Universidad Nacional de Colombia, es el Acuerdo 035 del Consejo Superior Universitario del 2003. En relación con los contratos laborales, la reglamentación establecida es muy clara al señalar la titularidad de la universidad sobre los derechos patrimoniales y el reconocimiento respectivo a los investigadores, en “todas aquellas actividades de carácter académico, laboral, o contractual que tengan por objeto la creación intelectual y se realicen como parte de sus compromisos laborales, contractuales o académicos con la Institución”; o “producto de investigaciones contratadas por terceros de acuerdo con los términos del contrato” o “producto de un año sabático o de una pasantía o una comisión de estudios en la universidad que realicen los profesores”, o “el producto de un trabajo de grado o una tesis financiado por la universidad y que no posea financiación externa ni haya sido desarrollada conjuntamente con terceros”.

Los acuerdos de confidencialidad que se firman con la CIB, no tienen en cuenta los siguientes aspectos: delimitación del proyecto en relación con objetivos y actividades, información sobre responsabilidades presupuestales, titularidad de los resultados, publicaciones, entregables, asuntos todos recomendados por Salazar y Silva, (2010).

El Acuerdo de Cooperación entre el CIB y la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín (UNAL-MED, según el acta de noviembre de 2005, contiene las siguientes condiciones:

- a) Obligaciones conjuntas CIB y UNALMED: Acordar la forma cómo se debe manejar la propiedad inte-

lectual y las regalías resultantes de investigaciones compartidas (Cláusula 2, numeral 3).

- b) Obligaciones de la CIB: Reconocer los acuerdos de las partes respecto a la propiedad intelectual según se establezca el desarrollo de proyectos conjuntos o se programe el desarrollo de publicaciones (Cláusula 3, numeral 6).
- c) Comité interinstitucional: Determinar previamente al inicio de cada proyecto la proporcionalidad de los derechos patrimoniales que le corresponden a la CIB y a la Universidad y a otros organismos patrocinadores, en las investigaciones definidas, de acuerdo con la cláusula 9 de este acuerdo. (Cláusula 7, numeral 8).
- d) Propiedad intelectual: Con la debida anticipación al inicio de cada proyecto de investigación la universidad y la CIB calculará y definirá el valor del aporte de cada una, tanto en personal, como en dinero y en recursos materiales e inmateriales. La valoración del capital humano, conocimientos, logros previos, instalaciones aportadas y cualquier otro insumo físico o inmaterial se hará de manera conjunta, consensual. Sobre la proporción que se fije a dichos aportes se considerará la participación de los derechos de propiedad intelectual. En consecuencia, la participación en los derechos patrimoniales derivados de las publicaciones que se realicen se distribuirán de manera proporcional a ese porcentaje. No obstante, los créditos y reconocimientos que deben hacerse en cada publicación no se verán afectados por el porcentaje de participación de cada institución. Igualmente cuando una de las instituciones argumente razones válidas para no publicar, la otra deberá abstenerse de hacerlo. El porcentaje de participación mencionado se aplicará también sobre las invenciones e innovaciones que se alcancen como fruto de trabajo conjunto. En forma idéntica de distribución las regalías o cualquiera otro crédito proveniente del licenciamiento de tecnologías comercializadas o de conocimientos o informaciones que lleguen a manejarse como secreto empresarial (Cláusula 9).

El convenio 057/07 aclara que el IICA tiene como objetivo, entre otros, formulación y ejecución de planes y programas, proyectos y actividades de apoyo para contribuir al logro de los objetivos de las políticas y programas de desarrollo de los Estados Miembro. Se encuentra dentro del marco de la Ley 29 /1990.

Mediante el convenio CIB – CEVIPAPA (066/2001) se desarrollaron los proyectos, “Evaluación molecular y biológica de la línea de papa transgénica que contiene genes Cry1Ab y Cry1Ac Bt”, e “Implementación plan de transferencia de tecnología de cultivo de papa a nivel nacional”.

**Tabla 3.** Datos consolidados de la documentación consultada para el estudio de la libertad de operación de la línea GM de papa que expresa el gene cry1Ac.

Actores	Tipo de Documento	Nombre del documento	Fecha de expedición	Contenido
CIB-Investigador	Acuerdo confidencialidad	Acuerdo de confidencialidad		Objeto es fijar los términos y condiciones para mantener la confidencialidad de los datos y la información obtenida del estudio.
CIB-Investigador	Cesión de Derechos			No existe
CIB-Investigador	Contrato Laboral			Se aplica Acuerdo 035 de 2003 artículo.2 Universidad Nacional
CIB-ICA	Contrato de Acceso a Recursos Genéticos	N/A		Para este tipo de estudio no se requiere
Universidad de Ottawa – CIB	ATM	Acuerdo de transferencia de material (ATM)	28/11/2011	*Datos generales del envío (responsables y direcciones) *Carta de referencia del acuerdo. *Condiciones del acuerdo. *Anexo A descripción del material (Ubi-Cry 1A(b)-NosTer, Ubi-Cry 1A(c)-NosTer, Pol-Cry 1A(b)-NosTer y 35s-Cry1A(b)-NosTer. *Anexo B Descripción de la investigación.
CIB-ICA	Título de obtentor	N/A		La variedad Pastusa Suprema está registrada comercialmente, pero no tiene título de obtentor.
UNCSM	Norma de PI-UN	Acuerdo 035 de 2003		
UNCSM-CIB	Acuerdo Cooperación	Acta- de ingreso UNCSM a la CIB	11/ 2005	11 cláusulas
IICA-MADR	Convenio	Convenio 057/07		
CIB - CEVIPAPA	Convenio	Convenio 066/01	05-08/2002 08-12/2002	
CIB - CEVIPAPA	Convenio	Convenio 04/03	03/10/2004	
CIB – Bolsa Nacional Agropecuaria	Convenio		2002	
IICA-CIB	Acuerdo financiación	Contrato 333/2007		Entidades participantes UNCSM, FEDEPAPA, UNCSB, CORPOICA, CIB y SAA
CIB-CORPOICA, FEDEPAPA UNCSB, UNCSM, SAA Centro Internacional de la papa	Alianza	Acta de entendimiento	02/2007	11 artículos
IICA-CIB	Acuerdo financiación	Contrato 337/2007		Contrato de cofinanciación con 24 Cláusulas. Acta de aprobación del proyecto No. 003 de 19 de junio de 2007 Entidades participantes UNCSM, FEDEPAPA, UNCSB, CORPOICA, CIB y SAA
CIB-ICA	Certificado Cámara y Comercio	Nº 0690	5/02/1997	Inscripción como institución
CIB - CC	Norma	Res- 1217 de 2002 ICA	30/10/2008	Registro como Unidad de Investigación en fitomejoramiento de materiales convencionales y modificados mediante ingeniería genética

Actores	Tipo de Documento	Nombre del documento	Fecha de expedición	Contenido
CIB-ICA	Norma	Res- 3723 de 2008 ICA	30/10/2008	*Modificación del Registro como Unidad de Investigación en fitomejoramiento de materiales convencionales y modificados mediante ingeniería genética *Incluye las instalaciones de la CIB, el invernadero y la casa de malla. *Subroga la Resolución 127 del 11 de junio de 2002.
CIB-ICA	Norma	Res- 1628 de 2010	10/05/2010	Autorización para realizar actividades de investigación en medio confinado con OVM de papa

Mediante el convenio CIB - CEVIPAPA (004/2003) se desarrolló el proyecto, "Evaluación molecular y biológica de línea de papa transgénica que contiene genes Cry1Ab y Cry1 Ac Bt".

Mediante el convenio CIB - Bolsa Nacional Agropecuaria (2002) se desarrolló el proyecto, "Desarrollo de líneas de papa transgénica con posible resistencia de *Tecia solanivora* utilizando genes Cry 1 Ab y Cry 1Ac de *Bacillus thuringiensis*".

Mediante el convenio CIB - IICA (333/2007) se desarrolló el proyecto, "Evaluación bajo condiciones de invernadero y campo de líneas transgénicas que contienen gene cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* para el posible control de *Tecia solanivora*".

Del acta de entendimiento de la alianza entre CIB, CORPOICA, FEDEPAPA, UNALMED, Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, Secretaria de Agricultura de Antioquia y Centro Internacional de la Papa, se resalta el artículo 6, sobre propiedad intelectual. "La alianza especificará dentro de la propuesta a presentar al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural los derechos de propiedad para los resultados del proyecto y los que se deriven de estos, correspondientes a cada una de las partes. Sin embargo, estos se pactarán una vez sea aprobado el proyecto por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y quedarían establecidos en el contrato que se suscriba para la realización del mismo".

Del convenio entre la CIB - IICA (337/2007, Derivado convenio 057/07), la cláusula 15 sobre propiedad intelectual, señala que esta "sujeta a la legislación nacional y supranacional vigente. Los derechos patrimoniales sobre los resultados protegibles que pudieren derivarse del proyecto pertenecerán al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia y demás entidades que tengan un aporte de cofinanciación en la contrapartida a prorrata de su participación en la financiación o en la ejecución del proyecto. Los datos podrán ser difundidos por cualquiera de las partes previa aprobación expresa y por escrito del MADR dando los créditos correspondientes. Los resultados del proyecto podrán ingresar a los sistemas de información previstos por el MADR y en general del sistema Nacio-

nal de Ciencia y Tecnología, para el desarrollo tecnológico y la utilización por parte de otros usuarios".

De la multiplicidad de instituciones que participaron en diferentes momentos a lo largo del proceso de investigación, entre las cuales se suscribieron documentos con especificaciones sobre el manejo de derechos de propiedad intelectual, resulta un escenario complejo. Este escenario debe ser resuelto, mediante una negociación conjunta, que facilite el uso de la línea GM que ha registrado altos niveles de control sobre la plaga, y es de muchísimo interés para los productores de papa. Estas negociaciones deben considerar el carácter público de la mayoría de instituciones participantes, como el hecho de que la innovación se generó en el convenio CIB- UNALMED. Este proceso es necesario para poder comercializar la semilla GM de papa, amén del estricto cumplimiento de la reglamentación nacional de bioseguridad para cultivos GM.

## Conclusiones

Es importante para las universidades y los centros de investigación que desarrollan productos agro-biotecnológicos, adelantar estudios de libertad de operación desde el inicio de cada investigación, para poder determinar los derechos de propiedad intelectual involucrados en el desarrollo de la innovación. En el presente estudio se encontró que a pesar de que en el escenario internacional existen 18 patentes y cuatro 4 solicitudes de patentes relacionadas con la línea GM de papa, debido a que no fueron solicitadas en Colombia, no afectan la posibilidad de uso comercial de la innovación, limitada al territorio nacional. En relación con la base de datos nacional, se registraron 13 solicitudes de patentes relacionadas con la innovación estudiada: cuatro negadas, dos desistidas, dos abandonadas, dos caducadas y cuatro están en requerimiento. También en la base nacional se registran dos patentes, ambas caducadas. Así las cosas, el escenario con relación a propiedad intelectual parece bastante despejado para la innovación.

Se analizaron los acuerdos que se generan en el proceso de investigación: de confidencialidad, de cesión de derechos, de transferencia de materiales, de financiamiento, y de cooperación. Así como contratos: labora-

les, de acceso a recurso genéticos, teniendo presente la normatividad institucional, nacional y supranacional. Allí si se identifican varios problemas. En primer lugar, en relación con el ATM firmado con la Universidad de Ottawa, la no inclusión de la variedad Pastusa Suprema y la limitación de uso para investigación. En segundo lugar, el complejo escenario de negociación sobre cláusulas de propiedad intelectual firmadas con ocho diferentes instituciones. Estos asuntos deben resolverse para poder comercializar la línea GM de papa con tolerancia a *Tecia solanivora*.

Cuando el análisis de libertad de operación no se realiza al inicio de una investigación, se debe hacer entonces, durante o al finalizar el estudio, antes que el producto obtenido como resultado, vaya a salir al mercado. Para ello, se debe realizar primero la deconstrucción del producto (Kryder *et al.*, 2000) a partir de la información contenida en los cuadernos de laboratorio y luego se procede con la búsqueda en bases de datos nacionales e internacionales de las patentes o las solicitudes en trámite, tomando en cuenta el principio de territorialidad. Es muy importante la actualización periódica del análisis de libertad de operación, en relación con las solicitudes en trámite que pueden aún no haberse publicado.

## Agradecimientos

A la División de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, por la financiación de este trabajo. A la Corporación para Investigaciones Biológicas y la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, en especial al profesor Rafael Arango y al investigador Diego Villanueva por la colaboración prestada.

## Referencias bibliográficas

Binenbaum E., Nottenburg C., Pardey P., Wright B., Zambrano, P. 2003. South-North trade, intellectual property jurisdiction and freedom to operate in agricultural research on staple crops. *Economic Development and Cultural Change*. 51 (2): 309-335.

BIOS. 2009. ¿What does "Freedom to Operate" mean?. Disponible en: <http://www.patentlens.net/daisy/patentlens/2768.html>. [Fecha de consulta 22 de mayo de 2013].

Boadi R. and Bokanga M. 2007. The African Agricultural Technology Foundation Approach to IP Management. En: Intellectual Property Management in Health and Agricultural Innovation: A Handbook of Best Practices (eds. A Krattiger, RT Mahoney, L Nelsen, et al.) Volumen II. Oxford, UK: MIHR and Davis, USA: PIPRA, p. 1085.

Brewster A., Chapman A. and Hansen S. 2007. Facilitating humanitarian access to pharmaceutical and agricultural innovation. En: Intellectual Property Management in Health and Agricultural Innovation: A Handbook of Best Practices (Krattiger A, Mahoney RT, Nelsen L, et al., eds.) Volumen I. Oxford, UK: MIHR and Davis, USA: PIPRA. p 981.

Chaparro-Giraldo A., Perafán R., Nemogá G., Vanegas P., Barbosa I., Ávila L., Blanco J., Díazgranados C., Yaya-Lancheros M. 2009. Propiedad Intelectual en la Era de los Cultivos Transgénicos. Bogotá: Editorial Universidad Nacional de Colombia. p 150.

Chi-Ham C., Clark K., Bennett A. 2010. The intellectual property landscape for gene suppression technologies in plants. *Nature Biotechnology*. 28: 32-36.

Decisión 486 de 2000 de la CAN. Régimen común sobre propiedad industrial. Norma legal citada.

Decreto 4525 de 6 de diciembre de 2005. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Por el cual se reglamenta la ley 740 de 2002. Norma legal citada.

Hong S. 2013. Claiming what Counts in Business: Drafting Patent Claims with a Clear Business Purpose. Disponible en: [http://www.wipo.int/sme/en/documents/drafting\\_patent\\_claims.htm](http://www.wipo.int/sme/en/documents/drafting_patent_claims.htm). [Fecha de consulta 22 de mayo de 2013].

James, C. 2012. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011 ISAAA Brief 43: ISAAA: Ithaca, NY.

Kimpel J. 1999. Freedom To Operate: Intellectual Property Protection in Plant Biology and Its Implications for the Conduct of Research. *Annual Review of Phytopathology*. 37(1): 29-51.

Kowalski S., Eborá R., Kryder R., Potter R. 2002. Transgenic crops, biotechnology and ownership rights: what scientists need to know. *Plant Journal*. 31(4): 407-421.

Kryder R., Stanley P., Kowalski S., Krattiger, A. 2000. A Preliminary Freedom- To-Operate. The Intellectual and Technical Property Components of pro-Vitamin A Rice (Golden Rice™): Review. ISAAA Briefs 20. Ithaca, USA: ISAAA. p. 56

Ortiz I., Escorsa E., Chi-Ham C. 2010. Guía de Buenas Prácticas para la Búsqueda de Información en Patentes. Fundación para la Innovación Agraria, PIPRA, Programa FIA- PIPRA. Disponible en [http://pipra.fia.cl/media/7647/manual\\_patentes.pdf](http://pipra.fia.cl/media/7647/manual_patentes.pdf). [Fecha de consulta mayo 22 de 2013].

Rodríguez E., Trujillo C., Orduz S., Jaramillo S., Hoyos R., Arango R. 2000. Estandarización de un medio de Cultivo adecuado para la regeneración de tallos a partir de hojas, utilizando dos variedades colombianas de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 53 (1): 887-899.

Salazar S. y Silva J. 2010. Guía para la gestión de la propiedad intelectual en consorcios regionales de investigación agrícola. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Disponible en <http://www.cofupro.org.mx/cofupro/eventos-realizados/redinnovagro/GESTION%20PROP%20INTELEC%20IICA.pdf>. [Fecha de consulta 22 de mayo de 2013].

Torres E. 2010. Desarrollo de líneas de papa transgénica, variedad Pastusa Suprema (*Solanum tuberosum* ssp. andigena), con posible resistencia a *Tecia solanivora*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín. Facultad de Ciencias. Posgrado en Biotecnología Medellín, p 120.

Tratado de cooperación en materia de patentes. Colombia de adhirió el 6 de diciembre de 2000. Norma legal citada.

Trujillo C., Rodríguez E., Arango R., Jaramillo S., Hoyos R., Orduz S. 2001. One- step transformation of two Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. subs. Andigena). *Plant Cell Report*. 20: 637-641.

Valderrama A., Velásquez N., Rodríguez E., Zapata A., Abbas M., Altosaar I., Arango, R. 2007. Resistance to *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Three Transgenic Andean Varieties of potato Expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Protein. *Journal Economic Entomology*. 100(1): 172-179.

Wolff T. 2008. Freedom-to-Operate: my six basic rules. *Searcher Magazine* 16: 34-39. Yancey, A. & Stewart, N. 2007. Are university researchers at risk for patent infringement?. *Nature Biotechnology*. 25(11): 1225-1228.



# Influence of 6-Benzyladenine and gelling agent on the reduction of hyperhydricity in *Tectona grandis* L.

## Influencia de la 6-Bencilaminopurina y el agente gelificante en la reducción de la hiperhidricidad en *Tectona grandis* L.

Elisa Quiala\*, Marco V. Jiménez-Tello\*, Raúl Barbón\*, Maité Chávez\*, Manuel de Feria\*, Mariana La O\*, Marta Pérez\*

### Abstract

The influence of different factors on shoot proliferation and the occurrence of hyperhydricity in teak (*Tectona grandis* L.) have been studied. Four concentrations of BA (2.22, 4.44, 6.66 and 8.88  $\mu\text{M}$ ) and a control treatment with 0 BA were examined. Aiming at reducing the costs during commercial propagation by using gelrite in stead of agar, the use of both gelling agent in the proliferation and hyperhydricity was tested. In order to evaluate if hyperhydricity can be reduced by increasing the gelrite concentration in the culture medium, three concentrations (2.0, 2.5 and 3.0  $\text{g l}^{-1}$ ) were tested in combination with 4.44  $\mu\text{M}$  BA. The proliferation and occurrence of hyperhydricity during 21 successive subcultures were evaluated. The highest proliferation was achieved in the treatments with 6.66 or 8.88  $\mu\text{M}$  BA. They yielded 5.22 and 5.56 shoots/explant, respectively. But also, the highest percent of hyperhydric shoots was achieved in this treatment. Gelrite resulted in a higher proliferation, but also an almost two times higher hyperhydricity as compared to agar-solidified media. Satisfactory reduction in hyperhydricity (18%) was achieved with 3.0  $\text{g l}^{-1}$  gelrite. However, the successive subcultures onto proliferation in this treatment favored hyperhydricity compromising shoot quality and its competence to proliferate. *In vitro* teak plants were ex *vitro* rooted and then transferred to greenhouse conditions for acclimatization; ten weeks after transfer they were ready for field plantation.

**Key words:** cytokinin, forestry, micropropagation, morpho-physiological disorder, teak

Abbreviations: BA- 6-Benzyladenine, MS- Murashige and Skoog basal medium, IBA- Indole-3-butyric acid, ANA-Naphtalene acetic acid

### Resumen

Se estudió la influencia de diferentes factores en la proliferación y la ocurrencia de la hiperhidricidad in teca (*Tectona grandis* L.). Se probaron cuatro concentraciones de BA (2,22; 4,44; 6,66 and 8,88  $\mu\text{M}$ ) y un control sin BA. Con el objetivo de reducir los costos durante la propagación comercial se experimentó sustituir el agar por el gelrite, para lo cual se estudió en efecto de ambos gelificantes en la proliferación y la hiperhidricidad de los brotes. Se estudiaron, tres concentraciones de gelrite (2,0; 2,5 and 3,0  $\text{g l}^{-1}$ ) combinadas con 4,44  $\mu\text{M}$  BA, con el objetivo de evaluar si la hiperhidricidad podía ser reducida incrementando la concentración de gelrite. Se evaluó la proliferación de brotes y la ocurrencia de la hiperhidricidad durante 21 subcultivos. Se logró una alta proliferación de brotes en los tratamientos con 6,66 y 8,88  $\mu\text{M}$  BA (5,22 y 5,56 brotes), pero el porcentaje de brotes hiperhídricos también se incrementó. El gelrite resultó en una alta proliferación de brotes, pero con mayor incidencia de la hiperhidricidad que el medio gelificado con agar. Se obtuvo una reducción satisfactoria de la hiperhidricidad (18%), cuando la concentración de gelrite se incrementó hasta 3,0  $\text{g l}^{-1}$ . No obstante, la multiplicación de los brotes en este tratamiento más allá del 11<sup>no</sup> subcultivo favoreció la hiperhidricidad, lo que afectó la calidad de los brotes y su competencia para la proliferación. Las plantas fueron enraizadas ex *vitro*, transferidas a condiciones de invernadero para su aclimatización y diez semanas después de la transferencia estaban listas para la plantación en campo.

**Palabras clave:** citoquinina, forestal, micropropagación, desorden morfo-fisiológico, teca.

**Recibido:** marzo 19 de 2013

**Aprobado:** abril 30 de 2014

\* Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5½, Santa Clara, Cuba. \*Corresponding author (elisa@ibp.co.cu), Tel 5342 281257, Fax 53 42 281329. E-mail: Marcos V. Jiménez-Tello: jr350ec@yahoo.es, Raúl Barbón: raulb@ibp.co.cu, Maité Chávez: maite@ibp.co.cu, Manuel de Feria: mdeferia@ibp.co.cu, Mariana La O: mariana@ibp.co.cu, Marta Pérez: martha@ibp.co.cu

## Introduction

*Tectona grandis* L. (teak) grows naturally throughout southeastern Asia and is one of the most valuable tropical hardwood species on the international market (Gyves *et al.*, 2007). Teak has been introduced into Central America (Panamá) in 1926 from Colombo (Sri Lanka) and in the following 20 years it was naturalized in almost all countries of Central America and the Caribbean (De Camino *et al.*, 1998). Teak is traditionally propagated through seeds and cuttings. However, due to low efficiency of traditional propagation methods to satisfy the high demand of teak, *in vitro* propagation has become an efficient way to produce teak plants as uniform as possible, on a large scale and in a short period of time (Monteuuis *et al.*, 1998; Daquinta *et al.*, 2001; Tiwari *et al.*, 2002; Yasodha *et al.*, 2005; Gyves *et al.*, 2007). However, sometimes the shoot quality is impaired by the occurrence of hyperhydricity (Castro *et al.*, 2002).

Hyperhydricity is induced by the combined action of several physical and/or chemical factors of the culture environment (Gaspar, 1991). Although most plants can adapt to these environmental conditions, some of them become abnormal with a translucent aspect due to chlorophyll deficiency and high water content (Debergh, 1983; Gaspar, 1991). The phenomenon has been considered as a morpho-physiology disorder and many physiological and biochemical changes have been observed (Ziv, 1991; Franck *et al.*, 2004). Some of these factors include the presence in the medium of growth regulators, of large quantities of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{Cl}^-$  ions, the type and concentration of the gelling agent, high relative humidity in the culture vessels (Debergh *et al.*, 1983; Ziv, 1991; Kevers *et al.*, 2004; Hazarika, 2006) and the successive subcultures of the explants in a culture medium with cytokinin (Vieitez *et al.*, 1985).

Cytokinins have been shown to induce hyperhydricity in many species, usually in a concentration-dependent manner and when other conditions in the culture system are not optimized (Ivanova and Van Staden, 2008; Mocaleán *et al.*, 2009).

Gelling agents are not an "inert" medium component, and their type and concentration have a significant effect on the performance of tissue cultured plant material (Debergh, 1983; Ziv, 1991; Pereira-Netto *et al.*, 2007), including the occurrence of hyperhydricity (Franck *et al.*, 2004).

Gelrite is a product derived from bacteria (*Pseudomonas elodea*) with consistent quality and high purity. Because substantially smaller quantities produce gels of hardness comparable to agar, gelrite appears to be an economically good gelling substitute for agar (Ivanova and Van Staden, 2010).

The successive subcultures of tissue cultured plant material for a long period of time can lead to a declining of proliferation rate and the occurrence of hyperhydricity (Vieitez *et al.*, 1985; Gómez *et al.*, 2007). Be-

cause the efficiency of commercial micropropagation, among others factors, are often determined by the number of plants produced from the initial explant, it is indispensable to know how many subcultures can be carried out during the proliferation stage without compromising the proliferation rate and plant quality.

After a meticulous revision in the literature about the *in vitro* commercial propagation of teak, no one research refers the evaluation of the proliferation of shoot up to the 7<sup>th</sup> subculture. Otherwise, although several research results have been described to overcome hyperhydricity, in various species, using different strategies such the evaluation of gelling agent type and concentration (Debergh *et al.*, 1981; Franck *et al.*, 2004; Ivanova *et al.*, 2006; Ivanova and Van Staden, 2011), no experience with teak has been reported.

The aim of this study was to determine the optimal concentration of BA to improve teak shoot proliferation (shoots/explants) with low occurrence of hyperhydricity (%). In order to reduce commercial propagation costs, the potential of gelrite and its most proper concentration as a possible replacement of agar was assessed, with special emphasis on achieving high proliferation and low occurrence of hyperhydricity. The study also aims at determining the maximum number of subcultures that can be carried out using the selected combination of BA and gelrite concentration and the development of the micro-propagated plants under *ex vitro* conditions.

## Materials and Methods

### Plant material and culture conditions

Apical shoots from plants cultured in the greenhouse and cloned from epicormic shoots of 30-year-old teak trees from Cuba were cut off. Shoots were surface-sterilised with ethanol (70% v/v) for 30 s. After rinsing three times with sterile distilled water, explants were dipped in a water solution containing 2% sodium hypochlorite and 0.2 ml Tween-80 for 10 min, followed by three rinses in sterile distilled water. The explants were then singly placed in test tubes (25 mm × 150 mm) with 10 ml of full-basal MS (Murashige and Skoog, 1962) medium supplemented with BA (4.44  $\mu\text{M}$ ), sucrose (2%; w/v), and solidified with 2.0 g l<sup>-1</sup> gelrite (Duchefa Biochemie, NL) to induce bud sprouting.

The pH was adjusted to 5.8 before autoclaving. After 48 hours, *in vitro* shoots were transferred to fresh medium to reduce browning. After 30 days the established apical shoots were transferred to the multiplication stage. The micropropagation cycle consisted of a monthly subculture of nodal segments after the removal of the new *in vitro* shoots onto a fresh medium to produce a large number of *in vitro* shoots. The cultures were incubated at 25±2°C with a 16 h light (fluorescent lamps with photon lux light intensity of 40  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

### **Experiment description**

Eight *in vitro* shoots were cultured per 25 ml of solid medium, distributed in a 250 ml glass culture container and there were ten replicates (flasks). Three experiments were conducted; each one was repeated three times. For all experiment each treatment comprised 80 explants. After 4 wks of culture, 40 explants were used to evaluate proliferation (number of shoots/explant) and occurrence of hyperhydricity (%) ( $n=120$ ). The number of shoots per explant (proliferation) was recorded. The newly-formed shoots were classified as normal shoots or hyperhydric shoots, according to their external appearance and the hyperhydricity (%) was calculated. Hyperhydric shoots had thicker, glassy and watery appearance compared to normal shoots.

### **Effect of BA concentration**

In the first experiment, the established apical shoots (figure 1A) were placed onto the multiplication medium. Four concentrations of BA (2.22, 4.44, 6.66 and 8.88  $\mu\text{M}$ ) and a control treatment with 0 BA were assessed. The conventional basal MS medium was supplemented with sucrose (2%; w/v), 100 mg  $\text{l}^{-1}$  myo-inositol and solidified with agar (6.6 g  $\text{l}^{-1}$ ).

### **Effect of gelling agent type**

In the second experiment, two types of gelling agent were compared: agar and gelrite (Duchefa Biochemie, NL) at concentrations of 6.6 and 2.0 g  $\text{l}^{-1}$  respectively, resulting in the same gel hardness of the media. The gel hardness was determined according to Huang *et al.*, 1995. The basal MS medium was supplemented with sucrose (2%; w/v), 100 mg  $\text{l}^{-1}$  myo-inositol and 4.44  $\mu\text{M}$  BA.

### **Effect of gelrite concentration**

In the third experiment, three concentrations of gelrite (2.0, 2.5 and 3.0 g  $\text{l}^{-1}$ ) were tested. The basal MS medium was supplemented with sucrose (2%; w/v), 100 mg  $\text{l}^{-1}$  myo-inositol and 4.44  $\mu\text{M}$  BA.

### **Effect of the number of subcultures**

Teak shoot were multiplied during 21 successive subculture onto basal MS medium supplemented with sucrose (2%; w/v), 100 mg  $\text{l}^{-1}$  myo-inositol, 4.44  $\mu\text{M}$  BA and solidified with gelrite (3.0 g  $\text{l}^{-1}$ ). Every second subculture, 40 explants were used to evaluate proliferation (number of shoots/explant) and occurrence of hyperhydricity (%).

### **Ex vitro rooting and acclimatization**

For *ex vitro* rooting and acclimatization 40 teak shoots ( $>2.5$  cm long) were harvested at the end of the 11<sup>th</sup> subculture. Shoots were washed with running tap water and

the basal callus was cutting. Shoots were *ex vitro* rooting according to Quiala *et al.* (2012), before being inserted into the substrate. The shoots were then planted in plastic containers (70 hole of 121  $\text{cm}^3$  capacity) and filled with an organic matter (humus and sugarcane mill baggasse): Zeolite (1:1) mixture. Once planted, the shoots were placed in a greenhouse ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , RH 90%) and maintained under 50% shade with intermittent-mist water sprays to avoid damage due to desiccation. The frequency of survival was recorded after 4 weeks. Ten weeks after transfer the plants were ready for field plantation.

### **Statistical analysis**

The normality of the data was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. Prior to statistical analysis, the hyperhydricity (%) data were transformed into arcsine to improve the normality of the data distribution. The significance of differences was determined by analysis of variance (ANOVA), and the significant ( $P<0.05$ ) differences among mean values were estimated by Fisher's LSD. All statistical tests were performed by SigmaStat software version 3.11. The data are presented as means  $\pm$  standard error, and different letters in the tables and figures indicate significant differences at  $P<0.05$ . The data presented in percentages were subjected to arcsine transformation before analysis, and then converted back to percentages for presentation in the tables and graphics. The experiment was arranged in a completely randomized design.

## **Results**

### **Effect of BA concentration**

Shoot proliferation was observed with all tested BA concentrations (table 1). On media with 2.22  $\mu\text{M}$  BA, an average of 2.84 shoots per explant was produced, also the lowest percent of hyperhydricity was achieved (table 1). Compared to the control, the higher proliferation of shoot was obtained when explants were grown on a medium containing either 6.66 or 8.88  $\mu\text{M}$  BA, yielding 5.22 and 5.56 shoots per explant, respectively. However, the occurrence of hyperhydricity was also higher (25 and 35%, respectively).

The best results on shoot proliferation were achieved on media with 4.44  $\mu\text{M}$  BA since an average of 4.88 shoots per explant was produced (table 1), similar to the treatments with 6.66  $\mu\text{M}$  BA, but with lower occurrence of hyperhydricity (15%) (table 1).

### **Effect of gelling agent type**

In this experiment the potential of gelrite as a possible replacement of agar was assessed with special emphasis on achieving high proliferation and low occurrence of hyperhydricity. As such commercial propagation costs could be reduced.

Significant differences associated with the used gelling agent were observed after 4 weeks of culture. Shoot proliferation was significantly higher with gelrite (4.84 shoots per explant) than with agar (3.70 shoots per explant). However, hyperhydricity was almost two times higher (34%) with gelrite as compared to agar-solidified media (16%; table 2).

### Effect of gelrite concentration

The increase of gelrite concentration from 2.0 to 2.5 g l<sup>-1</sup> or 3.0 g l<sup>-1</sup> did not affect the multiplication; significant reduction was no detected (table 3). Increasing the gelrite concentration reduced hyperhydricity. However, a significant reduction (18.1%) was achieved only at 3.0 g l<sup>-1</sup> gelrite (table 3).

### Effect of the number of subcultures

Shoot proliferation increased from the 1<sup>st</sup> to the 5<sup>th</sup> subculture (3.1 to 6.0 shoots per explant). Proliferation remained similar from the 6<sup>th</sup> to 11<sup>th</sup> subculture, ranging between 6.2 and 5.9 shoots per explant (figure 2A), while no significant increment of hyperhydricity were recorded from the 1<sup>st</sup> to the 11<sup>th</sup> subculture (figure 2B), ranging between 16.1 to 18.6%. However; more than 11 successive subcultures onto proliferation media with 4.44 µM BA and 3.0 g l<sup>-1</sup> gelrite resulted in low proliferation (figure 2B) and high hyperhydricity from the 12<sup>th</sup> to the 21<sup>st</sup> subculture. A ranging between 27.3 to 53.1% of the new shoots was hyperhydric. Furthermore, while healthy shoots with dark green color were majorly observed from the 1<sup>st</sup> to 11<sup>th</sup> subculture (figure 2B), from the 15<sup>th</sup> to the 21<sup>st</sup> subculture (figure 2B), whole explants, including all new shoots, with translucent and glassy appearance and a pale green-brown color (figure 1C).

**Table 1.** Effect of BA concentration on proliferation (number of shoots per explant) and hyperhydricity (%) of *T. grandis* shoots

[BA] (µM)	Proliferation (shoots/explant)	Hyperhydricity (%)
0.00	1.05±0.62 d	---
2.22	2.34±0.79 c	1 d
4.44	4.88±0.43 b	15 c
6.66	5.22±0.71 ab	25 b
8.88	5.56±0.52 a	35 a

Shoot explants were cultured on MS-based medium gelled with agar (6.6 g l<sup>-1</sup>). Data were collected after 4 weeks culture. Values represent the means (40 shoots per treatment, repeated three times, n=120) and EE=Standard Error. Data presented in percentages were subjected to arcsine transformation before analysis. Distinct letters in the same column indicate significant differences according to F-LSD test at P < 0.05.

### Ex vitro rooting and acclimatization

*In vitro* shoots from the 11<sup>th</sup> subculture produced new leaves within 15 days. Shoots surviving one month after planting (figure 1 D). Treating shoots with an IBA (492.1 µM) solution for 2 min resulted in 75% rooting. Ten week after transfer plants were ready for field plantation (figure 1E).

### Discussion

#### Effect of BA concentration on multiplication and hyperhydricity

In general, increasing the concentration of BA from 2.22 to 8.88 µM increased shoot proliferation, but the frequency of hyperhydricity also increased. According to the literature, BA is the most commonly used cytokinin in micropropagation of teak, alone or combined with kinetin or auxin (Monteuuis *et al.*, 1998; Gango-padhyay *et al.*, 2002; Tiwari *et al.*, 2002; Yasodha *et al.*, 2005; Gyves *et al.*, 2007; Akram and Aftab 2009). Hyperhydricity during tissue culture of teak has already been reported by Castro *et al.* (2002). They refer to the best results on shoot proliferation (2.5 shoots/explant) with 2.22 µM BA, with low occurrence of hyperhydricity (5%). Similar to our results, the authors point out that a higher concentration of BA results in higher proliferation but also in higher hyperhydricity. Goswami *et al.* (1999) suggested using a basal MS solid medium supplemented with BA and kinetin for teak shoot multiplication, achieving a mean of 3.7 normal shoots per explant in 8 weeks after subculture; but the number of hyperhydric shoots was not reported. Tiwari *et al.* (2002) showed that placement of the explants in MS medium supplemented with BA (22.2 µM) and a subsequent elongation step with 22.2 µM BAP + 0.25 µM IAA resulted in the maximum number of shoots after 8 weeks of culture. Although the BA concentration was high, the authors do not refer to the occurrence of hyperhydricity. Gyves *et al.* (2007) reported a high number of shoots for teak (4 shoots/explant) after 4 weeks

**Table 2.** Effect of gelling agent type on proliferation (number of shoots per explant) and hyperhydricity (%) of *T. grandis* shoots

Gelling agent	Proliferation (shoots/explant)	Hyperhydricity (%)
Agar	3.70± 0.81b	16 b
Gelrite	4.84± 1.01a	34 a

Shoot explants were cultured on MS-basal supplement with 4.44 µM BA. Data was collected after 4 weeks culture. Values represent the means (40 shoots per treatment, repeated three times, n=120) and EE=Standard Error. Data presented in percentages were subjected to arcsine transformation before analysis. Distinct letters in the same column indicate significant differences according to F-LSD test at P < 0.05.



**Table 3.** Effect of gelrite concentration on proliferation (number of shoots per explant) and hyperhydricity (%) of *T. grandis* shoots

Gelrite (g l <sup>-1</sup> )	Proliferation (shoots/explant)	Hyperhydricity (%)
2.0	4.71± 0.21a	29 a
2.5	4.66± 0.36a	25 a
3.0	4.61± 0.41a	18 b

Shoot explants were cultured on MS-basal supplement with 4.44 µM BA. Data was collected after 4 weeks culture. Values represent the means (40 shoots per treatment, repeated three times, n=120) and EE= Standard Error. Data presented in percentages were subjected to arcsine transformation before analysis. Distinct letters in the same column indicate significant differences according to F-LSD test at P < 0.05

of culture. They took steps to overcome hyperhydricity problems by modifying the MS medium (reducing the ammonium quantity) and by adding pectin (from grape must) to reduce the water content in the medium and by adding auxin and giberelin. According to general observations, these changes probably contributed to the improvement of the culture quality reducing visual hyperhydricity symptoms. However, although these techniques solve the hyperhydricity problems, the addition of pectin and a complex mix of three regulators of growth certainly increase the cost of commercial teak propagation.

Although the mechanism for hyperhydricity remains to be elucidated, it might take place during the axillary bud multiplication stage and has been correlated, among other factors, with the relatively high cytokinin level in the culture medium (Debergh 1983; Hazarika 2006). It has been reported that cytokinin induces hyperhydricity in many species, usually in a concentration-dependent manner and when other conditions in the culture system are not optimized (Ivanova et al., 2006; Moncaleán et al., 2009).

#### **Effect of gelling agent type on hyperhydricity and multiplication**

Agar was found to better control hyperhydricity than gelrite. The low frequency of hyperhydricity on a medium with agar might be due to a sulphated galactan in agar (Nairn et al., 1995), being able to control hyperhydricity. However, agar is expensive (Huang et al., 1995). From an economical point of view, during commercial propagation the gelling agent represents almost 90% of one unit (1 l) of culture medium (Pérez et al., 2000).

Gelrite promotes hyperhydricity in teak and similar results have been found with various species (Franck et al., 2004; Ivanova and Van Staden, 2010). The hypothesis about the effect of gelrite on hyperhydricity

seems to be related to its physical structure as supported by Ivanova et al., (2006). They found that higher levels of endogenous cytokinins were detected in shoots of *A. polyphylla* grown on gelrite media than those grown on agar-gelled media.

Shoot formation was higher on a medium gelled with gelrite as compared to agar. Similar results were reported for *Malus domestica* (Pasqualetto et al., 1988), *Allium cepa* (Jakse et al., 1996) and *Scrophularia yoshimurae* (Tsay et al., 2006). However, in agreement with Ivanova and Van Staden, (2010), we assumed that this effect of the gelling agent on the proliferation rate appears to be species-specific because more shoots were produced on media with agar of *A. polyphylla*.

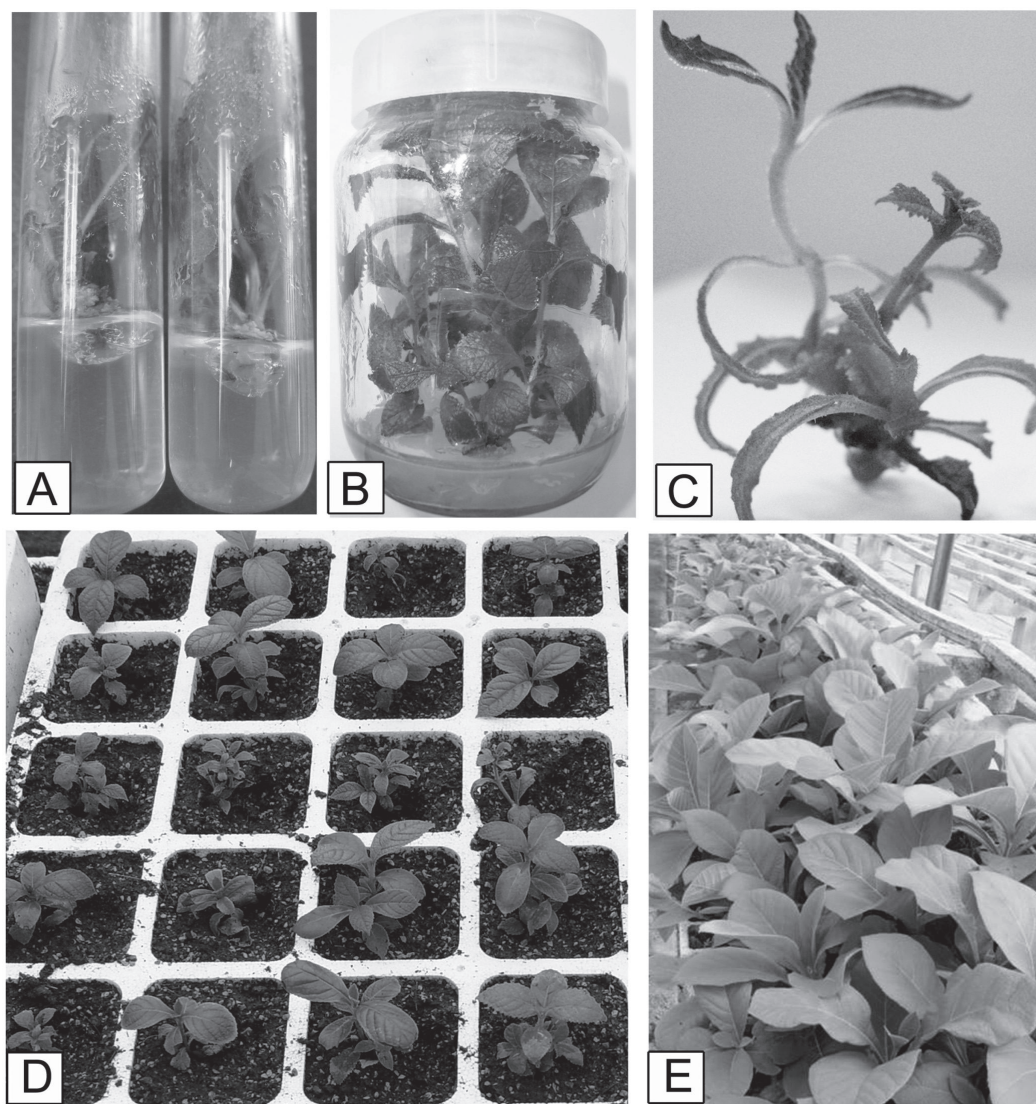
#### **Effect of gelrite concentration on hyperhydricity and multiplication**

Increasing gelrite concentration reduced hyperhydricity. Different authors refer to a similar positive effect of controlling hyperhydricity by increasing gelrite concentration in woody species such as *Picea abies* (Bornman and Vogelmann, 1984) and *Malus spp.* (Pasqualetto et al., 1988). However, in contradiction to our results, they refer to a negative effect on shoot proliferation. In our results, a negative side effect of the gelrite concentration was not observed, maybe because the amount of gelrite added from one treatment to another was low. Similar results were also reported for *A. polyphylla* (Ivanova and Van Staden, 2010). These authors report that increasing the gelrite concentration, and so decreasing the water availability in the media, reduced significantly the occurrence of hyperhydricity. However, in contradiction to their results, we did not achieve a negative side effect of this approach for shoot regeneration since no statistical differences were detected at p<0.05 level.

#### **Effect of the number of subculture on multiplication and hyperhydricity**

The successive subcultures onto proliferation media with 4.44 µM BA and 3.0 g l<sup>-1</sup> gelrite of more than the 11<sup>th</sup> one resulted in low proliferation and high hyperhydricity. Similar results were reported for *Castanea sativa* Mill (Vieitez et al., 1985). These authors pointed to a negative effect of growth regulators on hyperhydricity and low proliferation rate upon an increasing number of subcultures. A poor shoot multiplication was found with *Chimonanthus praecox* where the amount of viable tissue persistently decreased with each subculture (Kozomara et al., 2008). The quantity of *Eucalyptus globulus* shoots decreased from the 3<sup>rd</sup> to the 6<sup>th</sup> subculture when shoots were successively subcultured every 50 days on a proliferation medium with 4.44 µM BA and 0.05 µM naphthalene acetic acid (ANA) (Gómez et al., 2007).

Apparently, *in vitro* teak shoots are displaying various degrees of hyperhydricity. Some of them do not show macro-morphological perceptible changes, but the

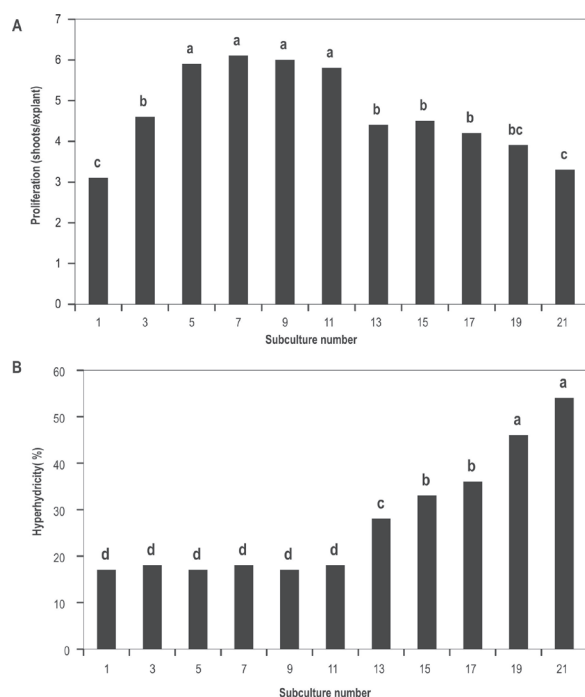


**Figure 1.** Micropropagation of 30-year old teak (*T. grandis*). **A** Apical shoots *in vitro* established in basal MS medium supplemented with BA (4.44  $\mu$ M). **B** Glass culture container with *in vitro* teak shoot from the 3<sup>rd</sup> subculture in basal MS medium supplemented with BA (4.44  $\mu$ M), and solidified with 3.0 g l<sup>-1</sup> gelrite. **C** *In vitro* teak shoot showing hyperhydricity symptoms, observed from the 15<sup>th</sup> to the 21<sup>st</sup> subculture (note that whole explants, including all new shoot, display translucent and glassy appearance and a pale green-brown color). *Ex vitro* rooting and acclimatization of teak plantlets cultured during 11<sup>th</sup> subculture in solid medium. **D** 4-week old plants after transfer to *ex vitro* conditions. **E** 10-week old plants after transfer to *ex vitro* conditions ready for field plantation.

subculture of this type of shoot for a long time to new vitrifying conditions (culture medium with BA and gelrite) may lead to over-accumulate severe morpho-physiological disorder, reducing proliferative competition and quality. According to Kevers *et al.* (2004), the process of hyperhydricity is generally considered as reversible. The authors point out that the hyperhydric state (of newly formed shoots) can also be maintained through several subcultures without too much change, but subculturing hyperhydric shoots in vitrifying conditions may lead to severe damage, including death of

the whole shoot as such, through apparent necrosis of all primary meristems.

From the result, the costs during commercial propagation of teak could be reduced by using gelrite in stead of agar, but the advantage is limited since the successive subculture more than 11<sup>th</sup> subculture affects the shoots quality and its competition to proliferate. Because the often cultures transferred to freshly media with agar and lower cytokinin concentrations successfully recover from hyperhydricity, alternating the subculture of teak shoots into agar-gelled medium + 4.44  $\mu$ M



**Figure 2. A)** Proliferation (shoot/explant). **B)** Hyperhydricity (%) of *T. grandis* shoots formed from the 1st to the 21st subculture. Data in each subculture were collected after 4 weeks culture. Values represent the means (40 shoots per each subculture). Data presented in percentages were subjected to arcsine transformation before analysis. Distinct letters in the same column indicate significant differences according to F-LSD test at  $P < 0.05$ .

BA and gelrite-gelled medium + 2.22  $\mu\text{M}$  BA, could be a solution for achieve high shoot proliferation controlling hyperhydricity upon the 11<sup>th</sup> subculture passage.

### Ex vitro rooting and acclimatization

A high survival rate was observed with *ex vitro* rooted teak shoots. Rooting is one of the most difficult steps in micropropagation of woody species, and forest rooting is usually performed *ex vitro* because of the low frequency of *in vitro* rooting. *In vitro* rooting is often preferred because plants perform much better in terms of plant quality as they have the advantage of already possessing roots during the acclimatization phase (De Klerk, 2002). However, *ex vitro* rooting of teak is attractive because of the simultaneous rooting and hardening of plants. It also cuts the cost of production significantly (Tiwari *et al.*, 2002).

In this study, we achieved a frequency of survivor of 75%, but in an earlier study, we found that it is possible to enhance the quality of teak plants obtained from solid culture, by using a temporary immersion system with 0 or with 2.22  $\mu\text{M}$  BA in the last subculture of

the multiplication stage, achieving a high frequency of survivor (96.7 and 91.7%, respectively) during acclimatization (Quiala *et al.*, 2012).

In conclusion, the present study shows that even though BA is indispensable for the *in vitro* propagation of teak, high concentrations of this cytokinin result in more occurrence of hyperhydricity. Otherwise, the type of gelling agent is critical for controlling hyperhydricity during *in vitro* propagation of teak. When agar was substituted with gelrite, a high proliferation was achieved, but hyperhydricity also increased. By increasing gelrite concentration to 3.0 g l<sup>-1</sup> was an effective strategy for reduce hyperhydricity without affecting shoot proliferation, but maintaining the explants in this conditions (4.44  $\mu\text{M}$  BA + gelrite) during successive subcultures enhance hyperhydricity.

### Acknowledgments

We would like to express particular thanks to Rafael Gómez Kosky and Idalmis Caraballoso for critical review of the manuscript. We are also grateful to Oswald Van Cleemput for his kind help in revising the English language. This research was supported by the Cuban Ministry of Science, Technology and Environment (CITMA).

### References

- Akram M., Aftab F. 2009. An efficient method for clonal propagation and *in vitro* establishment of softwood shoots from epicormic buds of teak (*Tectona grandis* L.). *For Stu China*. 11: 105-110.
- Bornman C.H., Vogelmann T.C. 1984. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*. *Physiol Plant*. 61:505-512.
- Castro D., Díaz G., Linero J. 2002. Propagación clonal *in vitro* de árboles élités de teca (*Tectona grandis* L.). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 4:49-53.
- Daquinta M., Ramos L., Capote I., Lezcano Y., Rodríguez R., Trina D., Escalona M. 2001. Micropropagación de la teca (*Tectona grandis* L.F.). Comunicación técnica. *Revista Forestal Centroamericana*. 25-28
- De Camino, RV, Alfaro, MM, Sage, LFM. 1998. Teak (*Tectona grandis*) in Central America, Forest Plantations Working Papers. Roma, IT, FAO. 64 p. (Working Paper FP/19). <http://intranet.catie.ac.cr/intranet/posgrado/CopiadeBB506SilvBosques/semana2/ArticuloTeca FAO.pdf> . Consultado el 12 de agosto de 2009.
- De Klerk GJ. Rooting of microcuttings: theory and practice. 2002. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 38:415-422.
- Debergh PC, Harbaoui Y, Lemeur R. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol Plant*. 53: 181-187.
- Debergh P.C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol Plant*. 59:270-276.
- Franck T., Kevers C., Gaspar T., Dommes J., Deby C., Greimers R., Serteyn D., Deby-Dupont G. 2004. Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelrite: a controlled stress response. *Plant Physiol Biochem*. 42: 519-527.
- Gangopadhyay G., Das S., Mitra S.K., Poddar R., Modak B.K., Mukherjee K.K. 2002. Enhanced rate of multiplication and rooting through the use of coir in aseptic liquid culture media. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 68:301-310.



- Gaspar T. 1991. Vitrification in micropropagation, in: Y.P.S. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, High-Tech and Micropropagation I*, Springer-Verlag, Berlin, 17: 117–126.
- Gómez C., Ríos D., Sánchez-Olate M. 2007. Efecto del subcultivo sucesivo sobre la caulogénesis adventicia de *Eucalyptus globulus*. *Bosque*. 28:13-17.
- Goswami H., Keng C.L., Teo C.K.H. 1999. *In vitro* shoot proliferation of *Tectona grandis* L. *Journal Bioscience*. 10:47–54.
- Gyves, E. M., Juwartina I., Royani J. I., Rugini E. 2007. Efficient method of micropropagation and *in vitro* rooting of teak (*Tectona grandis* L.) focusing on large-scale industrial plantations. *Annals of Forest Science*. 64: 73-78.
- Hazarika B.N. 2006. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*. 108:105–120.
- Huang L-C., Kohashi C., Vangundy R., Murashige T. 1995. Effects of common components on hardness of culture media prepared with gelrite. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 31:84–89.
- Ivanova M., Novák O., Strnad M., Van Staden J. 2006. Endogenous cytokinins in shoots of *Aloe polyphylla* cultured *in vitro* in relation to hyperhydricity, exogenous cytokinins and gelling agents. *Plant Growth Regulation*. 50:219–230.
- Ivanova M., Van Staden J. 2008. Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of *in vitro* regenerated shoots of *Aloe polyphylla*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 92:227–231.
- Ivanova M., Van Staden J. 2010. Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 104:13–21.
- Jakse M., Bohanec B., Ihan A. 1996. Effect of media components on the gynogenic regeneration of onion (*Allium cepa* L.) cultivars and analysis of regenerants. *Plant Cell Rep*. 15:934–938.
- Kevers C., Franck T., Strasser R.J., Dommes J., Gaspar T. 2004. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 77:181–191.
- Kozomara B., Vinterhalter B., Radojević Lj., Vinterhalter D. 2008. *In vitro* propagation of *Chimonanthus praecox* (L.), a winter flowering ornamental shrub. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 44:142 – 147.
- Moncaleán P., Fal M.A., Castañón S., Fernández B., Rodríguez A. 2009. Relative water content, *in vitro* proliferation, and growth of *Actidiana deliciosa* plantlets are affected by benzyladenine. *N Z J Crop Hortic Sci*. 37:351–359.
- Monteuuis O., Bon M., Goh D. 1998. Teak propagation by *in vitro* culture. *Bois et Forêts des Tropiques*. 226:1-11.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15: 473 – 497.
- Nairn B.J., Furneaux R.H., Stevenson T.T. 1995. Identification of an agar constituent responsible for hydric control in micropropagation of radiata pine. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 43:1–11.
- Pasqualetto P-L, Zimmerman R.H., Fordham I. 1988. The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 14:31–40.
- Pereira-Netto A.B., Petkowicz C.L.O., Cruz-Silva C.T.A., Gazzoni M.T., Mello A.F.P., Silveira J.L.M. 2007. Differential performance of marubakaido apple rootstock shoots grown in culture media containing different agar brands: dynamic rheological analysis. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 43:356–363.
- Pérez J.N., Suárez M., Orellana P. 2000. Posibilidades y potencial de la Propagación Masiva de Plantas en Cuba. *Biotechnología Vegetal*. 1: 3-12.
- Quiala E., Cañal M.J., Meijón M., Rodríguez R., Chávez M., Valledor L., de Fera M., Barbón R. 2012. Morphological and physiological responses of proliferating shoot of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 109:223–234.
- Tiwari S.K., Tiwari K.P., Siril E.A. 2002. An improved micropropagation protocol for teak. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 71:1–6.
- Tsay H-S., Lee C-Y., Agrawal DC., Basker S. 2006. Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae*—a medicinal plant. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 42:445–449.
- Vieitez A., Ballester A., San José M., Vieitez E. Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated *in vitro*. *Physiol Plantarum*. 65: 177-184, 1985.
- Yasodha R., Sumathi R., Gurumurthi K. 2005. Improved micropropagation methods for teak. *J Trop For Sci*. 17:63–75.
- Ziv M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds) *Micropropagation: technology and application*. Kluwer, Dordrecht. pp 45–69.



## Evaluación de la fermentación del lactosuero ácido (entero y desproteínizado) utilizando *Lactobacillus casei*

### Evaluation of acid whey fermentation (whole and deproteinized) using *Lactobacillus casei*

Katia Cury Regino\*, Margarita Arteaga Márquez\*\*, Guillermo Martínez Flórez\*\*\*, Deivis Luján Rhenals\*\*\*\*, Alba Durango Villadiego\*\*\*\*\*

#### Resumen

El lactosuero acidificado espontáneamente pone en riesgo la salud del consumidor al utilizarlo como acidificante de la leche usada en la elaboración del queso tipo mozzarella, y además reduce la calidad del producto. El objetivo de esta investigación fue evaluar el proceso de fermentación del lactosuero ácido (entero y desproteínizado) con *Lactobacillus casei*, utilizando diferentes porcentajes de su inóculo. Se caracterizaron fisicoquímicamente los lactosueros, sometidos a fermentación anaeróbica a 37°C y 120 rpm por 96 h. Se evaluó la concentración de biomasa celular, el consumo de lactosa, la producción de ácido láctico (AL) y se estimaron los parámetros cinéticos y estequiométricos. Se aplicó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 2x3, empleando la metodología de medidas repetidas. Los datos, se procesaron a través de los paquetes estadísticos SAS® versión 9 y Statgraphics Centurión XVI®. El lactosuero, entero y desproteínizado, se encontró dentro de los intervalos fisicoquímicos aceptables para su acidificación. Los valores de acidez fueron superiores a 120 Grados Dornic (120°D) con la inoculación de *L. casei*, excepto en lactosuero desproteínizado, inoculado con 15% de cultivo. El lactosuero entero con 15% de inóculo, alcanzó 120°D en el menor tiempo (34h). Altas concentraciones de inóculo (15%) favorecieron la acidificación en el lactosuero entero, mostrando la mayor producción (20.83gAL/l),  $Y_p/s=0.86$ ,  $Q_p=0.173\text{gAL/l}^*\text{h}$ ; mientras el lactosuero desproteínizado mostró un mayor crecimiento microbiano, menor conversión de lactosa (8.2%) y menor producción media de ácido láctico (8.19g/l).

**Palabras clave:** suero lácteo, ácido láctico, queso hilado, parámetros cinéticos.

#### Abstract

The spontaneously acidified whey threatens consumer health and reduces quality of mozzarella cheese. The goal of this research was to evaluate the acidification process of acid whey (whole and deproteinized) by fermentation with different inoculum concentrations of *Lactobacillus casei*. The whey was physicochemically characterized and anaerobically fermented at 37°C and 120 rpm during 96h. Cellular biomass was evaluated, as well as lactose consumption, lactic acid production, kinetic and stoichiometric parameters were estimated. A completely randomized design with factorial arrangement (2x3) was applied by using the repeated measures methodology. Data was processed by using SAS® statistical package, version 9 and Statgraphics Centurion XVI®. The acidification for the whole and deproteinized whey was found within the acceptable intervals. Acidification values were above 120 degrees Dornic (120°D) with *L. casei* inoculation, except in the deproteinized whey inoculated with 15% of inoculum. The whole whey with 15% of inoculum reached 120°D in the shortest time (34 hours). High concentrations of inoculum (15%) aided the acidification in whole whey and showed the highest production (20.83 g LA/l), and  $p/s=0.86$ ,  $Q_p=0.173\text{ g AL/l}^*\text{h}$ ; on the other hand, the deproteinized whey showed the highest microbial growth, lowest conversion of lactose (8.2%) and lowest lactic acid production (8.19g/l).

**Key words:** whey, lactic acid, cheese yarn, kinetic parameters.

**Recibido:** noviembre 16 de 2013      **Aprobado:** mayo 2 de 2014

\* MSc. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad de Sucre. Cra. 28 # 5-267, Sincelejo, Colombia. katiacuryr@hotmail.com

\*\* MSc. Departamento de Ingenierías, Universidad de Córdoba.

\*\*\* Doctor en Estadística. Departamento de Matemáticas y Estadística, Universidad de Córdoba.

\*\*\*\* Doctor en ciencia de los alimentos. Departamento de Ingenierías, Universidad de Córdoba.

\*\*\*\*\* Doctor en ciencia y tecnología de alimentos. Departamento de Ingenierías. Universidad de Córdoba.

## Introducción

En los procesos de obtención de queso, caseína o coprecipitados, se genera lactosuero. Se estima que a partir de 10 litros de leche de vaca se puede producir de 1 a 2 kg de queso y un promedio de 8 a 9 kg de lactosuero, lo cual representa cerca del 85 - 90% del volumen de la leche, que contiene alrededor del 55% de sus nutrientes; es decir que el volumen de lactosuero es aproximadamente 7 a 10 veces mayor que el queso producido, según su variedad (Liu *et al.*, 2005; Callejas *et al.*, 2012).

Actualmente, la producción de lactosuero se constituye en un problema ambiental (Parra, 2009); si se consideran los altos volúmenes producidos, su vertimiento en fuentes naturales de agua o en suelos sin haber sido sometido a tratamiento y sin considerar su carácter contaminante, dada la cantidad de nutrientes que posee. Sólo una parte de lactosuero producido es aprovechado adecuadamente, aproximadamente el 47% de las 115 millones de toneladas de lactosuero producido a nivel mundial son desechadas al ambiente sin tratamiento previo, lo que además de ocasionar un gran daño ecológico, también representa una pérdida significativa de recursos (Guerrero *et al.*, 2012). Se estima que, en términos de composición y de valor energético, los sólidos del lactosuero son comparables a la harina de trigo (357 Kcal/100 g) (Inda, 2000; Laguna, 2011).

Como consecuencias de su inadecuada disposición, en los suelos se produce saturación de los mismos y en las aguas, debido a la presencia de alto contenido de nutrientes en el lactosuero, se genera un contenido de materia orgánica del 40 al 60 g/l de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) y entre 50 y 80 g/l de Demanda Química de Oxígeno (DQO) de lactosuero líquido (Kavacik y Tapaloglu, 2010; Guerrero *et al.*, 2012), siendo la lactosa el principal componente de los sólidos que contribuye a la alta DBO y DQO (Ghaly y Kamal, 2004; Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Koutinas *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2009; Kavacik y Tapaloglu, 2010; Guerrero *et al.*, 2012).

Para el año 2012, Colombia presentó una producción de 10 millones de kilogramos de queso comercializado, en los Departamentos de Antioquia y Cundinamarca, de donde se produjeron aproximadamente 90.000.000 l de lactosuero (Martínez, 2012). En los Departamentos de Córdoba y Sucre, alrededor del 70% del total de la producción lechera se destina a la elaboración de queso, ya sea artesanal o industrialmente. La fabricación no estandarizada de quesos constituye un renglón importante en la economía de muchos pobladores, siendo un producto de consumo masivo (Gallegos *et al.*, 2007). Empresas productoras de quesillo o queso tipo mozzarella fermentan de manera espontánea el lactosuero por acción de microorganismos presentes en él, proveniente de la leche cruda o por contaminación durante el proceso, esta reacción es favorecida por los sustratos que contiene el lactosuero y la temperatura ambiental (32°C) de la región, pero estas fermentaciones se producen de manera no controlada de modo que en algu-

nos casos podrían representar un riesgo para la salud del consumidor y van en detrimento de la calidad del producto obtenido; lo conveniente es realizar fermentaciones controladas empleando microorganismos y condiciones adecuadas para garantizar mejoras en el proceso y en el producto obtenido.

El propósito de esta investigación fue evaluar el proceso de acidificación de lactosuero ácido (entero y desproteínizado) por fermentación con *Lactobacillus casei*, para su utilización en elaboración de quesos de pasta hilada, buscando determinar la influencia del tratamiento aplicado al lactosuero y el porcentaje de inóculo adicionado, como alternativa para el aprovechamiento de los nutrientes que contiene este subproducto, de modo que sea posible desarrollar una tecnología que permita suprimir la fermentación espontánea del lactosuero, la que afecta la calidad sanitaria del producto terminado, y mejorar las características organolépticas del mismo; aprovechando que el empleo de *L. casei* produce un sabor ácido, inhibición de organismos patógenos, reducción de contenido de lactosa y formación de aromas, entre otros (Parra, 2010).

## Metodología

**Localización del proyecto.** El estudio se realizó en la Planta Piloto de Operaciones Unitarias de la Universidad de Sucre, ubicada en la Granja Los Pericos del Municipio de Sumpués – Sucre, Colombia. Los análisis fisicoquímicos se desarrollaron en los Laboratorios de Bromatología y Bioingeniería, y de Microbiología de la Universidad de Sucre, y en el Laboratorio de Control de Calidad de la empresa Colquesos.

**Obtención de los lactosueros.** Los lactosueros utilizados para el estudio proceden de la elaboración de queso tipo Mozzarella (lactosuero ácido entero) y a partir del proceso de obtención de requesón (lactosuero ácido desproteínizado), procesos desarrollados por la empresa Colquesos. Fueron almacenados en refrigeración a 4°C para posteriores análisis.

**Caracterización de los lactosueros utilizados.** Los lactosueros se caracterizaron fisicoquímicamente utilizando las técnicas que se describen a continuación: Acidez (AOAC 947.05, 2009 adaptado; Jaramillo, 1993), Densidad (AOAC 925.22, 1990), pH (AOAC 981.12, 1990), Sólidos Totales (AOAC 925.105, 1990 adaptado), Proteína (AOAC 920.05, 1990 adaptado), Nitrógeno (AOAC 976.06, 1990), Materia grasa (AOAC 989.04, 1990 adaptado, CAA, Tomo II, 13-8, 1989), Cenizas (AOAC 945.05, 1990 adaptado) y Lactosa (AOAC 16051, 1984). Las mediciones fueron realizadas en base húmeda.

## Fermentación

### Activación del microorganismo y mantenimiento del cultivo

Cepas liofilizadas de *Lactobacillus casei* ATCC 393®, fueron activadas según las instrucciones del inserto. A

partir de cultivo obtenido, se realizaron repiques periódicos de las cepas en agar MRS®, incubándolas a 37°C durante dos días y posteriormente almacenándolas a 4°C (Hujanen y Linko, 1996).

**Preparación del Cultivo Madre.** 800 ml de leche entera UHT, fueron calentados a 37°C e inoculados con 5-6 azadas del caldo de cultivo de la cepa *Lactobacillus casei* ATTC 393®, previamente activado, que presentaba una turbidez de 0.5 en la escala de McFarland, lo cual corresponde a aproximadamente  $1 \text{ a } 2 \times 10^6$  UFC/ml; luego se incubó a 37°C hasta formar un coágulo transparente y firme; característica tomada como referencia, considerando que las bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus casei* en productos como la leche, tienen la capacidad de formar geles (Parra, 2010). Desde la siembra, hasta la formación del coágulo, se realizaron mediciones de biomasa con Cámara de Neubauer, cada 2 horas y se midió la acidez.

Para el control se tomaron 100 ml de leche entera UHT a 37°C, que fueron incubadas sin la siembra del microorganismo de modo que se pudiera comprobar la no existencia de contaminación por presencia de otros microorganismos.

**Pretratamiento de lactosueros y preparación del cultivo de adaptación (Preinóculo).** El lactosuero ácido entero se sometió a pasteurización lenta para garantizar el crecimiento del cultivo seleccionado, sin lograr la desproteinización del mismo; posteriormente fue enfriado hasta 37°C. Para el lactosuero desproteinizado (procedente de un tratamiento térmico severo) no se consideró necesario la pasteurización.

Se preparó un cultivo de adaptación (Preinóculo) para cada lactosuero, empleando 10% del cultivo madre y adicionando los lactosueros hasta completar 1000 ml. No se suplementaron los lactosueros, debido a que se quería conocer su capacidad como sustrato únicamente con su composición usual (Álvarez y Aguirre, 2008). Se realizaron mediciones de pH, acidez y recuento de microorganismos, en intervalos de una hora; se consideró que los cultivos presentaban condiciones óptimas para ser inoculados al observar un conteo superior a  $10^8$  UFC/ml, momento en el cual se suspendió la fermentación mediante una disminución lenta de la temperatura a 4°C.

**Proceso de fermentación batch.** La fermentación se llevó a cabo en 6 montajes diseñados siguiendo las especificaciones del fermentador aerobio – anaerobio TECFERM® 2L serie 0204, fabricado por Tecferm y distribuido por PBM Colombia (2003). Se realizaron 3 repeticiones por cada batch, se controló la temperatura a 37°C (Serna y Rodríguez, 2005b; Aguirre et al., 2009; Escobar et al., 2010; García, 2012), con agitación a 120 rpm durante 96 h (Lee, 2005; Serna y Rodríguez, 2005 a,b; Serna y Rodríguez, 2007). No se suministro oxígeno.

Los lactosueros fueron inoculados con cepas del cultivo de *Lactobacillus casei*, en un 5, 10 y 15% (v/v) de los 700 ml en cada repetición, bajo condiciones asepticas. Para el control, se sometieron ambos lactosueros a las mismas condiciones de fermentación, pero sin la adición de microorganismo.

**Seguimiento de la fermentación.** Se realizó un seguimiento de los parámetros: consumo de sustrato, recuento en placa, acidez desarrollada, contenido de nitrógeno y proteína y estimación de parámetros cinéticos. Se realizaron mediciones a las 2, 4, 6, 8, 10, 22, 34, 46, 58, 72 y 96 horas.

**Consumo de sustrato.** Para establecer el comportamiento en relación al consumo de sustrato (lactosa), se tomó como base la curva patrón de azúcares reductores, determinada por el método colorimétrico modificado DNS (ácido dinitrosalicílico). La concentración de lactosa del medio de cultivo, fue medida por el método espectrofotométrico a 540 nm (AOAC 16051, 1984; Serna y Rodríguez, 2005a; Serna y Rodríguez, 2007).

**Recuento en placa.** Se utilizó peptona universal (0.1% p/v), para realizar diluciones sucesivas de las muestras inoculadas hasta  $10^8$  UFC/ml en proporción 1:9. Se sembró en profundidad en agar MRS y se incubó a 37°C, por 72h en condiciones de anaerobiosis. El conteo de células viables se realizó como UFC/ml y se expresó como unidades logarítmicas (UFC/ml). Para cada sustrato en los tiempos de control, el recuento se efectuó por triplicado. Se estableció, a través de preensayos que se debían realizar diluciones de  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  UFC/ml.

**Acidez desarrollada.** Fue medida mediante titulación según AOAC 947.05, 2009, en grados Dornic (°D). Tomando como referencia la acidez requerida en lactosuero a emplear en elaboración de quesos de pasta hilada, según lo reportado por la empresa Colquesos (mínimo 120°D) (información primaria; suministrada por el departamento de calidad de la empresa Colquesos, Jaramillo et al., 1993).

**Contenido de nitrógeno y proteína.** Fue determinado por el método Kjeldahl (AOAC 976.06, 1995), para luego calcular el porcentaje de proteína.

**Estimación de parámetros cinéticos.** Se calcularon los parámetros cinéticos  $Y'_{p/s}$ : Rendimiento del producto a partir del sustrato,  $Y'_{p/x}$ : rendimiento del producto con respecto a la biomasa, Qp: Productividad volumétrica del ácido láctico, Qx: Productividad volumétrica de biomasa, a través de las variables de respuesta: concentraciones de lactosa, recuento en placa y acidez, en relación al tiempo de fermentación para cada uno de los tratamientos. (Jakymec et al., 2001; García, 2012).

**Procesamiento y análisis.** Se aplicó análisis de varianza ANAVA, pruebas de comparación de Duncan y polinomios ortogonales. Se realizaron análisis por cada

tiempo y al final se realizó una regresión para ver el efecto del tiempo. Como prueba de validación se aplicó Shapiro-Wilk y la prueba de homogeneidad de varianza de Hartley.

Los parámetros estequiométricos y cinéticos fueron evaluados aplicando un análisis de varianza (ANOVA) a los diferentes tratamientos y una prueba de comparación de medias de Duncan a los tratamientos que mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Se aplicó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial  $2 \times 3$ , donde el factor 1 fue el tipo de lactosuero empleado, con 2 niveles (suero ácido entero y suero ácido desproteínizado) y el factor 2 fue la cantidad de inóculo empleado, con 3 niveles 5, 10 y 15%, con tres repeticiones, para un total de 18 unidades experimentales. Se evaluó el consumo de lactosa, producción de ácido láctico, los parámetros cinéticos y estequiométricos durante las 96 horas de fermentación. Se emplearon los programas estadísticos STATGRAPHICS® Centurión XVI (Warrenton, Virginia, U.S.A, 2009) y SAS® versión 9 (North Carolina, USA, 2003).

## Resultados y Discusión

**Caracterización del lactosuero.** En la tabla 1 se muestran las características fisicoquímicas de los lactosueros empleados en la investigación.

La caracterización realizada a los lactosueros coincide con el intervalo de valores reportado para lactosuero ácido y lactosuero de requesón por Guerrero *et al.*, (2012). En el suero desproteínizado se observa una mayor concentración de acidez que en el entero, posiblemente causada por el calor al efectuar la desproteínización, al igual que una disminución en el contenido de nitrógeno. Los valores de nitrógeno y proteína para este suero son comparables a los encontrados por Urribarri *et al.* (2004). Los resultados obtenidos para el lactosuero entero son similares a los reportados por Monsalve y González (2005); Madrid (1994); Panesar *et al.* (2007) y Franchi (2010).

El valor del pH en los dos tipos de lactosueros, los define como sueros ácidos (Miranda *et al.*, 2009), pudiéndose considerar medianamente ácido al suero entero y ácido al desproteínizado, de acuerdo a lo observado por Gutiérrez (2006); estudios realizados señalan que la mayoría de las bacterias ácido lácticas tienen alta tolerancia a pH por debajo de 5.0, lo que les da ventaja competitiva sobre otras bacterias (Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000).

Relación de la acidificación con el tipo de lactosuero e inóculo. Al evaluar la interacción entre el tipo de lactosuero y la concentración del inóculo, se aprecia una diferencia altamente significativa ( $p < 0.05$ ) en los tiempos de fermentación analizados, por lo que influye en la formación del ácido láctico; observándose un efecto favorable a mayor concentración de inóculo y lactosuero desproteínizado; Obteniéndose con el lac-

tosuero entero y 15% de inóculo, la acidez más alta con un promedio de  $108^{\circ}\text{D}$ , en los demás casos se formaron dos grupos estadísticamente significativos conformados por los tratamientos con lactosuero entero inoculado con 5 y 10%; lactosuero desproteínizado inoculado con 5, 10 y 15%. El tratamiento con mayor acidez se presentó en los lactosueros enteros; el inóculo del 15% logró una mayor acidez media en todos los tratamientos y las concentraciones de 5 y 10%, no mostraron diferencias significativas para el porcentaje de inóculo ( $p > 0.05$ ).

Se observa que el lactosuero entero y las altas concentraciones del inóculo al inicio de la fermentación favorecen una alta acidificación del medio. Similar a lo reportado por Aguirre *et al.* (2009) y Hernández-Miranda *et al.* (2007), quienes afirman que el crecimiento de los *Lactobacillus* se debe en parte a la composición de nutrientes de la materia prima inicial y el nivel de inóculo utilizado.

Entre los dos tipos de lactosuero, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en el valor de la acidez durante las primeras 10h de la fermentación. Lo cual concuerda con lo reportado por Machado *et al.* (2007), quienes establecieron que a mayores tiempos de fermentación del suero lácteo se obtiene mayor cantidad de ácido láctico. Sin embargo, investigaciones Aguirre y colaboradores (2009), señalan que la producción de ácido láctico inhibe el desarrollo de biomasa del *L. casei*. Para contrarrestar este efecto, se recomienda la estrategia de cultivo por lote alimentado, la cual consiste en realizar montajes de cultivo en batch en donde se pueda alimentar continuamente medio nutritivo fresco o alguno de sus componentes.

Para la elaboración de quesos de pasta hilada, se requiere el uso de lactosuero ácido con  $120^{\circ}\text{D}$  mínimo (información primaria, suministrada por el departamento de calidad de la empresa Colquesos; Jaramillo *et al.*, 1993). En la figura 1 se muestra el comportamiento de la acidificación de los tratamientos con lactosuero entero y lactosuero desproteínizado inoculado al 5% y 10% y 15% con *L. casei*.

En los tratamientos con lactosuero entero inoculados al 5 y 10%, el valor de referencia ( $120^{\circ}\text{D}$ ), se alcanzó a las 82 y 86h, respectivamente; mientras que con el lactosuero desproteínizado el valor se alcanzó a las 72h y 87h, respectivamente. En el tiempo de 34h, el lactosuero entero inoculado al 15% alcanzó la acidez deseada, lo cual no se consiguió para el suero desproteínizado aun completándose las 96h de la fermentación.

Como sustrato, el lactosuero entero mostro un comportamiento que favorece la síntesis de producto, mientras el lactosuero desproteínizado beneficia el crecimiento del microorganismo, este comportamiento está acorde con los estudios reportados por Orozco y Solarte (2003), en donde los microorganismos toman los nutrientes del medio y lo utilizan para llevar



**Tabla 1.** Características fisicoquímicas de los lactosueros.

	Lactosuero desproteinizado (LD)	Lactosuero entero (LE)
Ceniza (%)	0,22±0,13	0,45±0,26
Lactosa (g/dL)	4,37±0,03	4,12±0,06
Densidad (g/ml)	1,026±0,00	1,029±0,00
Ph	4,8±0,00	5,35±0,00
Acidez (°D)	34,67±0,58	28±0,00
Nitrogeno (N)	0,098±0,00	0,185±0,01
Proteína (%)	0,628±0,02	1,03±0,15
Grasa (%)	DLD	0,3±0,00
ST (%)	5,22±0,11	6,09±0,37
Humedad (%)	94,78±0,11	93,91±0,37

DLD: Debajo del límite de detección

a cabo todas sus funciones metabólicas, una vez que se verifica el crecimiento de la biomasa se favorece la biosíntesis de un metabolito como producto. En muchos casos el producto de las fermentaciones industriales es la biomasa, pero en la gran mayoría de los esquemas de producción son sustancias de alto valor agregado por fermentación.

#### **Cinética de crecimiento, consumo de sustrato y formación del producto.**

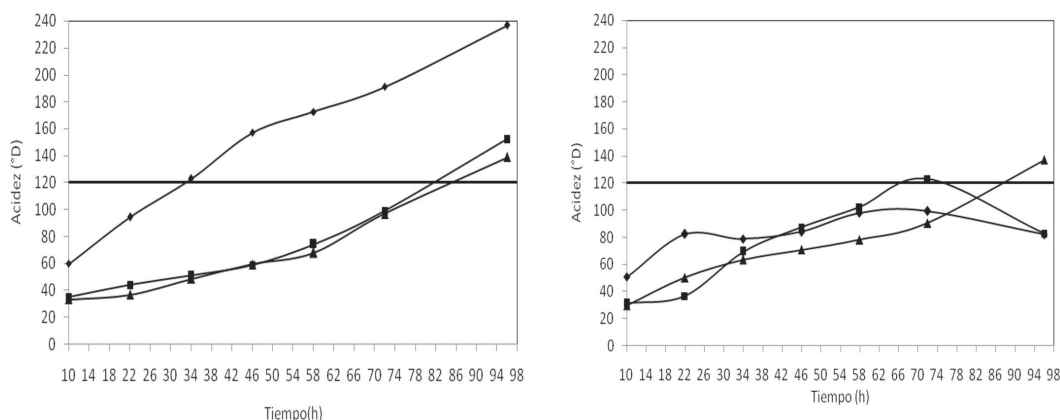
En las figuras 2, 3 y 4 se muestra la evolución en la formación de ácido láctico, concentración de lactosa y recuento de *L. casei*, durante la fermentación de los lactosueros con diferentes porcentajes de inóculos.

Se evidenció que en los medios con 5% de inóculo (figura 2) al final del periodo de fermentación (96h) la concentración de lactosa fue de 27,7 g/l en el lactosuero entero y 40,1 g/l en el desproteinizado, correspondiente a una conversión del 32,8% y 8,2% de lactosa, respectivamente. Esto concuerda con lo encontrado por Serna y Rodríguez (2007), quienes concluyeron

que la concentración de azúcares totales muestra un efecto inverso sobre la concentración de ácido láctico.

El mayor crecimiento fue de  $3,08 \times 10^8$  UFC/l en el lactosuero desproteinizado y de  $2,88 \times 10^8$  UFC/l en el entero, a las 96h de fermentación. El comportamiento del lactosuero desproteinizado al ser empleado como sustrato, sugiere que en este se encuentran, además de los micronutrientes señalados en la caracterización, factores de crecimiento, aminoácidos y ácidos grasos, considerados esenciales para el crecimiento y la producción de ácido láctico por *L. casei*. Comportamientos similares fueron reportados por Serna y Rodríguez (2007).

En los medios inoculados con 10% del cultivo (figura 3), para el lactosuero entero y desproteinizado, se logró una conversión de lactosa del 43,6% y 22,2% y una concentración de ácido láctico 13,9g/l y de 13,7 g/l, respectivamente. Al final de la fermentación del lactosuero entero e inoculado con 10%, se observa una reducción del crecimiento del microorganismo de  $3,16 \times 10^8$  UFC/l a las 72h hasta  $1,86 \times 10^8$  UFC/l a las 96h; mientras en el lactosuero desproteinizado no se observó reducción del crecimiento. Estudios reali-



**Figura 1.** Acidificación con *L. casei* debido al efecto de lactosuero a) entero y b) desproteinizado, inoculado al ■: 5%, ▲:10% y ♦: 15%.

zados por Jakimec *et al.* (2001) demostraron que los rendimientos de biomasa disminuyen al aumentar la concentración de lactosa, de modo que la mayor concentración de ácido láctico se obtiene en suero desproteinizado sin adición de lactosa, evidenciando que entre mayor es la concentración del sustrato, mayor es la velocidad de consumo y que la producción de ácido láctico origina una disminución del pH en el medio, lo cual afecta el crecimiento, el consumo y la producción. Este efecto se presentó con el lactosuero entero, que muestra mayor producción de ácido, pero menor crecimiento en términos de biomasa.

Con respecto a los medios inoculados con un 15% del cultivo (figura 4), durante la fermentación del lactosuero entero, se logró la mayor concentración final de ácido láctico (20,8 g/l), una conversión de 36,2% de lactosa y  $3,63 \times 10^8$  UFC/l de *L. casei*; caso contrario en el lactosuero desproteinizado donde se obtuvo la menor concentración final de ácido láctico (8,1 g/l).

Las figuras 2, 3 y 4 concuerdan con lo reportado en la tabla 2, donde se observa que los tratamientos con lactosuero entero obtuvieron las mayores conversiones de lactosa a ácido láctico, a las tres concentraciones de inóculo. La menor conversión (8,2%) fue en el lactosuero desproteinizado e inoculado con 5% de *L. casei* y 5,09 g/l de ácido láctico, mostrando que la fermentación se direccionó al desarrollo del *L. casei*.

La concentración promedio de *Lactobacillus casei* fue de  $2,82 \times 10^8 \pm 0,097$  UFC/l a las 96 h de fermentación. De acuerdo con lo reportado por García (2012) se confirma que el efecto de la suplementación favorece la bioconversión a ácido, ya que cuando se suplementó con una fuente de nitrógeno se mejoró la velocidad de bioconversión, duplicándose el ácido láctico producido (De Lima *et al.*, 2009).

En la tabla 2, se presentan los valores medios obtenidos de la concentración de la biomasa de *L. casei*, ácido láctico y lactosa para los diferentes tratamientos a través del tiempo de fermentación. Se observó que

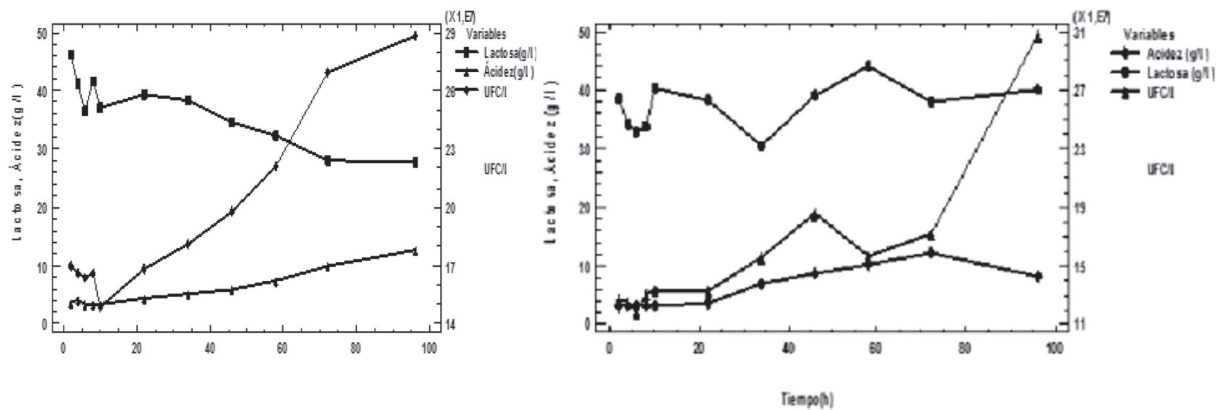


Figura 2. Perfil de fermentación con *L. casei* en lactosuero a) entero y b) desproteinizado con 5% de inóculo.

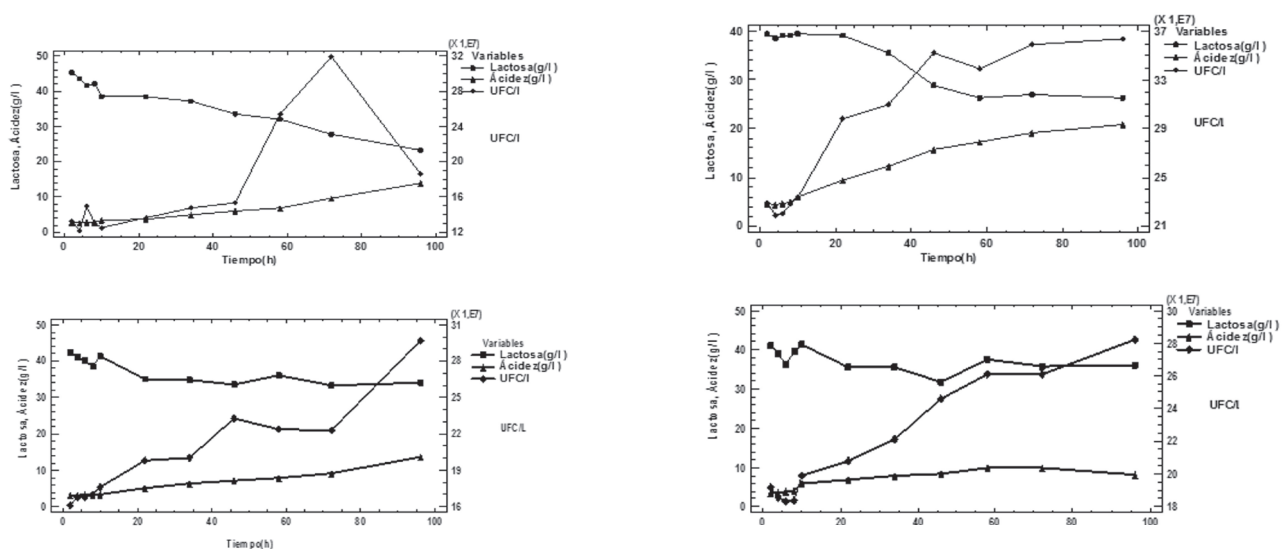


Figura 3. Perfil de fermentación con *L. casei* en lactosuero a) entero y b) desproteinizado con 10% de inóculo.

Figura 4. Perfil de fermentación con *L. casei* en Lactosuero a) entero y b) desproteinizado con 15% de inóculo.

el tipo de lactosuero, inóculo y la interacción de estos muestran un efecto significativo ( $p<0,05$ ) sobre el crecimiento, el consumo de sustrato, la formación de producto y los rendimientos de la fermentación.

El tratamiento con lactosuero desproteínizado inoculado al 5% favoreció el crecimiento del *L. casei* comparado con el lactosuero entero, donde se obtuvo el menor crecimiento con el inóculo del 10% de cultivo. Respecto a la producción, cabe destacar que el tratamiento con lactosuero entero y 15% de inóculo, mostró la mayor producción de ácido láctico, mientras que el lactosuero desproteínizado con 15% de inóculo presentó la menor. En cuanto al consumo de lactosa, el tratamiento con lactosuero entero y 10% de inóculo, presentó el mayor consumo de lactosa, y el lactosuero desproteínizado con 5% de inóculo evidenció el menor; lo cual indica que el lactosuero desproteínizado fue un medio propicio para el desarrollo del microorganismo en lugar de sintetizar producto, mientras que en el lactosuero entero el rendimiento del producto con respecto a la biomasa ( $Y'p/x$ ) fue superior.

Parámetros fermentativos. Basado en los datos experimentales de concentración de lactosa, ácido láctico y recuento de *L. casei*, los coeficientes estequiométricos fueron determinados para formación de producto, consumo de sustrato y biomasa (tabla 3) en cada uno de los tratamientos, donde los factores de variación mostraron un efecto significativo ( $p<0,05$ ) sobre estos. El rendimiento de producto a partir del sustrato ( $Y'p/s$ ) fue más estable en los tratamientos con lactosuero entero que cuando se usó el desproteínizado, y no está relacionado directamente con el logro de la acidificación del medio al estándar requerido ( $120^{\circ}D$ ). El medio con lactosuero entero e inoculado con 15% de cultivo madre logró la acidificación a las 34h de fermentación, contrastado con el mejor rendimiento  $Y'p/x$  igual a 80,38.

Los rendimientos obtenidos  $Y'p/s$  son superiores a los reportados por Mirdamadi et al. (2008) quienes encontraron rendimientos de 0,47 a 0,33 (g ácido láctico / g lactosa) cuando suplementaron con glucosa, por otro

lado, Plessas et al. (2008) obtuvieron rendimientos de 0,23 (g ácido láctico / g lactosa) en lactosuero diluido y no diluido usando *L. helveticus*, al igual que a los obtenidos por Aguirre et al. (2009) en suero de leche de cabra en un cultivo batch ( $Yp/s$  de 0,52 g ácido láctico / g lactosa quienes emplearon suero de leche de cabra en un cultivo batch y por García (2012) quien empleando lactosuero desproteínizado suplementado con sulfato de amonio y lactosa logro rendimientos de 0,5306 y 0,2488 (g ácido láctico / g lactosa).

El máximo rendimiento teórico de ácido láctico producido debe ser de 1,05 g Ac. Láctico/g Lactosa, lo cual en la práctica, generalmente no ocurre y se obtienen rendimientos de alrededor un 85% en los mejores casos (Serna y Rodríguez, 2005b). Los resultados de este estudio difieren con lo observado en sustratos como el lactosuero, dado que en condiciones teóricas un sustrato puro adicionaría una fuente de vitaminas y cofactores que son aprovechados en su totalidad, sin considerar que una parte de estos en la realidad no son transformados, pues son usados para la realización de las actividades metabólicas del microorganismo.

Los resultados muestran que altas concentraciones de inóculo favorecen la acidificación en el lactosuero entero, mientras que en el lactosuero desproteínizado el crecimiento microbiano fue mayor y favorecido por la baja concentración inicial de inóculo. Varios factores estimulan el crecimiento y tienen considerable efecto sobre la producción de ácido láctico, entre ellos la mezcla de aminoácidos y péptidos usualmente no solo estimulan el crecimiento y resultan en velocidades de crecimiento mucho más altas (Vásquez, 2008).

La evaluación de la productividad  $Q_p$  y  $Q_x$ , evidenció que el tratamiento con lactosuero entero y 15% de inóculo presentó mayor productividad en relación a la formación de ácido láctico, siendo la menor la obtenida en el lactosuero desproteínizado inoculado con 5% de *L. casei*; esto concuerda con el comportamiento mostrado al evaluar los rendimientos  $Y'p/s$  en esta investigación, y con lo establecido por Serna y Rodríguez (2005b),

**Tabla 2.** Medias de Producción biomasa, ácido láctico y consumo de lactosa.

Tratamientos		Concentración de Biomasa X(UFC/l)	Producto A. Láctico P(g/l)	Consumo Lactosa S (g/l)
1	LE 5	$1,18 \times 10^8 \pm 0,009^{ac}$	$8,88 \pm 0,12^a$	$13,50 \pm 0,63^a$
2	LE 10	$5,28 \times 10^7 \pm 0,02^b$	$11,21 \pm 0,035^b$	$17,96 \pm 0,49^b$
3	LE 15	$1,36 \times 10^8 \pm 0,03^{abc}$	$16,27 \pm 0,12^c$	$14,92 \pm 0,28^a$
4	LD 5	$1,82 \times 10^8 \pm 0,005^d$	$5,09 \pm 0,087^d$	$3,57 \pm 0,80^c$
5	LD 10	$1,36 \times 10^8 \pm 0,011^c$	$10,50 \pm 0,036^e$	$9,69 \pm 0,33^d$
6	LD 15	$9,06 \times 10^7 \pm 0,049^{ab}$	$4,51 \pm 0,07^f$	$7,72 \pm 0,35^e$

LE: lactosuero entero, LD: lactosuero desproteínizado, 5=5% inóculo, 10=10% inóculo, 15=15% inóculo. Valores con igual letra, en una misma columna, no son significativamente diferentes, ( $\alpha=0,05$ )

para quienes las cepas que generan altas concentraciones y rendimientos, tienen altas productividades.

Respecto a  $Q_x$ , se encontró que la mayor productividad fue obtenida en el lactosuero desproteínizado con 5% de inóculo, y la menor en el tratamiento con lactosuero entero inoculado con 10% de *L. casei*, estos resultados concuerdan con lo establecido por Aguirre et al. (2009), quienes afirman que dado que el producto principal del metabolismo de *L. casei* es el ácido láctico, se inhibe el desarrollo de biomasa, recomendando el uso de la estrategia de cultivo por lote alimentado para conseguir altas productividades, tanto de biomasa como de producto.

En otra investigación similar, Urribarrí et al. (2004), evaluó la producción de ácido láctico a partir de lactosuero desproteínizado suplementado con extracto de levadura y peptona trípica de caseína fermentada en un cultivo continuo con *L. helveticus*, se encontró una tasa específica de crecimiento máximo de  $\mu_{max} = 0,469 \pm 0,012/h$ , un rendimiento real de  $Y_c = 0,759 \pm 0,061$  kg de biomasa producido/kg de lactosa consumida para crecimiento, similar a lo observado en la presente investigación para el lactosuero entero con 10% de inóculo. La máxima concentración de biomasa y ácido láctico fue de 55 y 10,97 kg/m<sup>3</sup>, siendo la máxima productividad de biomasa y ácido láctico 6,2 y 1,83 kg/m<sup>3</sup>.h, respectivamente. Estos resultados sugieren el potencial uso del lactosuero como sustrato para bacterias homolácticas (Urribarrí et al., 2004).

## Conclusiones

Los parámetros fisicoquímicos de los lactosueros entero y desproteínizado provenientes de la elaboración de queso tipo mozzarella y requesón, se encuentran dentro de los intervalos aceptables para su acidificación y

posterior empleo como suero ácido en la elaboración de nuevos lotes de producción de este tipo de queso.

La acidificación del lactosuero en los diferentes tratamientos se logró con la inoculación de *L. casei* a 37°C, 96h y 120rpm, obteniéndose valores superiores a 120°D, excepto en el lactosuero desproteínizado con 15% de cultivo.

El lactosuero entero inoculado al 15% con *L. casei* presentó el menor tiempo de acidificación, mayor valor de  $Y'p/s = 0,86$  g/g, al igual que la mayor productividad (0,173 gAL/lh). Sin embargo, el mayor crecimiento del cultivo se experimentó en lactosueros desproteínizados, sin alcanzar el valor de acidificación deseada durante el tiempo de fermentación.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo para el desarrollo de esta investigación a la empresa Colquesos, a la Universidad de Córdoba (Colombia) y su programa de Maestría en Ciencia Agroalimentarias, a la Universidad de Sucre y a la Secretaría de Desarrollo Económico y Medio Ambiente de la Gobernación de Sucre.

## Referencias bibliográficas

- Aguirre E. J., Ramírez A., Álvarez M. 2009. Producción de *Lactobacillus casei* a partir de suero de leche en cultivos batch, fed-batch y continuo. En: XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. Acapulco, México: Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.
- Almeida K.E., Tamime A.Y., Oliveira M.N. 2009. Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology*. 42(2): 672-678.
- Álvarez M., Aguirre J. 2008. Proceso de alto rendimiento para la producción de biomasa probiótica de bacterias lácticas a partir de suero de leche no suplementado. Patente mexicana en trámite. MX/a/2008/016564.

**Tabla 3.** Valores de los Coeficientes estequiométricos.

Tratamientos	Lactosa inicial (g/l)	Acidez °D	Rendimientos Experimentales			Productividad Volumétrica	
			$Y'p/s$ g/g	$Y'p/s$ g/g	$Y'p/x$ g/g	$Qp$ gAL/l h	$Qx$ UFC/l h
LE 5%	41,2	152	0,65 <sup>a</sup>	0,0169 <sup>a</sup>	38,83 <sup>a</sup>	0,095	1,25 x10 <sup>6</sup>
LE 10%	41,2	139	0,62 <sup>a</sup>	0,0081 <sup>a</sup>	77,32 <sup>b</sup>	0,119	5,62 x10 <sup>5</sup>
LE 15%	41,2	236	0,86 <sup>c</sup>	0,0136 <sup>a</sup>	80,38 <sup>b</sup>	0,173	1,44 x10 <sup>6</sup>
LD 5%	43,7	82	0,49 <sup>c</sup>	0,1080 <sup>b</sup>	13,18 <sup>c</sup>	0,054	1,93 x10 <sup>6</sup>
LD 10%	43,7	137	0,68 <sup>b</sup>	0,0275 <sup>a</sup>	39,43 <sup>a</sup>	0,112	1,45 x10 <sup>6</sup>
LD 15%	43,7	81	0,58 <sup>a</sup>	0,0218 <sup>a</sup>	26,88 <sup>ac</sup>	0,048	9,64 x10 <sup>6</sup>

LE: lactosuero entero, LD: lactosuero desproteínizado, 5=5% inóculo, 10=10% inóculo, 15=15% inóculo.  $Y'p/s$ : Rendimiento del producto a partir del sustrato (g/g),  $Y'x/s$ : rendimiento de biomasa con respecto al sustrato (g/g),  $Y'p/x$ : rendimiento del producto con respecto a la biomasa (g/g),  $Qp$ : Productividad volumétrica del ácido láctico (gAL/lh),  $Qx$ : Productividad volumétrica de biomasa (UFC/lh). Valores con igual letra, en una misma columna, no son significativamente diferentes, ( $\alpha=0,05$ )



- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. 1990. Washington, USA.
- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. Manual of Official Methods of Analysis. 15th Edition. 1995. Washington, USA.
- Callejas J., Prieto F., Reyes V., Marmolejo Y., Méndez M. 2012. Caracterización fisicoquímica de un lactosuero: potencialidad de recuperación de fósforo. *Acta Universitaria*. 22(1): 11-18
- De Lima C., Fontes L., Blanco K., Contiero J. 2009. Response surface optimization of D(-)-lactic acid production from *Lactobacillus* SM18 using corn steep liquor and yeast autolysate as nitrogen sources. *African Journal of Biotechnology*. 8 (21): 5842-5846.
- Escobar L., Rojas C., Giraldo G., Padilla L. 2010. Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus casei* y producción de ácido láctico usando como sustrato el suero de leche de vacuno. *Revista de Investigaciones de la Universidad del Quindío*. (20):42-49.
- Franchi O. 2010. Suero de leche, propiedades y usos. Recuperado de <http://www.buenastareas.com/ensayos/Suero-De-Leche-Usos/1792630.html>.
- Gallegos J., Arrieta G., Mattar S. Poutou R., Trespalacios A., Carrascal A. 2007. Frecuencia de *Listeria spp.*, en quesos colombianos costeros. *Revista MVZ Córdoba*. 12(2): 996-1012. Disponible en: <http://revistas.unicordoba.edu.co/ojs/index.php/mvz/article/viewFile/139/136>.
- García, C. 2012. Producción de ácido láctico l(+) a partir de lactosuero utilizando *Lactobacillus casei* en un cultivo batch. Tesis de Maestría en Ciencias Agroalimentarias. Universidad de Córdoba.
- Ghaly A., Kamal M. 2004. Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Research*. 38(3): 631-644.
- Guerrero W., Castilla P., Cárdenas K., Gómez C., Castro J. 2012. Degradación anaerobia de dos tipos de lactosuero en reactores UASB. *Tecnología Química*. 33(1): 99-106.
- Höfvendahl K., Hahn-Hägerdal B. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*. 26(2): 87-107.
- Hujanen M., Linko Y. 1996. Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+) lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 45(3): 307- 313.
- Inda A., 2000. Optimización de Rendimiento y Aseguramiento de Inocuidad en la Industria de la Quesería. Una guía para la pequeña y mediana empresa. Organización de los Estados Americanos (OEA), División de Ciencia y Tecnología. pp. 63-93. México
- Jakymec M., Morán H., Páez G., Ferrer J., Mármol Z., Ramones, E. 2001. Cinética de la producción de ácido láctico por fermentación sumergida con lactosuero como sustrato. *Revista Científica FCV-Universidad de Zulia*. 11(1):53 -59.
- Jaramillo M., Mejía L., Sepúlveda J. 1993. Quesos Frescos y de Pasta Hlada. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos.
- Kavacik B., Topaloglu B. 2010. Biogas production from co-digestion of a mixture of cheese whey and dairy manure. *Biomass and Bioenergy*. 34(9): 1321-1329.
- Koutinas A., Papapostolou H., Dimitrellou D., Kopsahelis N. Katechaki E., Bekatorou A., Bosnea L. 2009. Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. *Bioresource Technology*. 100(15): 3734-3739.
- Lagua H. 2011. Elaboración de una bebida nutritiva a partir de la pulpa de maracuyá (*pasiflora incarnata*), y suero láctico, en la planta procesadora de frutas y hortalizas de la Universidad Estatal de Bolívar. Tesis de Grado. Escuela de Ingeniería Agroindustrial. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Universidad Estatal de Bolívar. Guaranda, Ecuador.
- Lee K. 2005. Comparison of fermentative capacities of *Lactobacilli* in single and mixed culture in industrial media. *Process Biochemistry*. 40(5):1559-1564.
- Liu X., Chung Y.K., Yang S.T., Yousef A.E. 2005. Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. *Process Biochemistry*. 40(1): 13-24.
- Machado A., Gorrochotegui L., Cardenas A. 2007. Recuperación del ácido láctico de suero lácteo fermentado utilizando la técnica de electrodiálisis. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*. 30(1): 56-63. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0254-07702007000100007&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0254-07702007000100007&script=sci_arttext). Consultado el 11 de julio de 2013.
- Madrid A. 1994. Manual de Tecnología Quesera. 2ª edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Martínez A. 2012. Bebida deslactosada y fermentada a partir del lactosuero, con pulpa de maracuyá, y enriquecida con l-glutamina, Tesis de Maestría en Ciencias Agroalimentarias. Universidad de Córdoba, Argentina.
- Hernández-Miranda A., Matos-Chamorro A. 2011. Importancia del lactosuero en la industria de alimentos como bebida isotónica. En: *Congreso Internacional de Investigación*. Universidad Peruana Unión. Lima, Perú.
- Miranda O., Ponce I., Fonseca P., Cutiño M., Díaz R., Cedeño C. 2009. Características físico-químicas de sueros de queso dulce y ácido producidos en el combinado de quesos de Bayamo. *La Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*. 19(1): 21-25.
- Mirdamadi S., Atashgahi S., Rajabi A., Aziz-Mohseni F., Roayaei M., Hamed J. 2008. Cell entrapment of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 39392 for lactic acid production. *Iranian Journal of Biotechnology*. 6(1): 16-21.
- Monsalve J., González D. 2005. Elaboración de un queso tipo ricotta a partir de suero lácteo y leche fluida. *Revista Científica FCV-Universidad de Zulia*. 15(6): 543-550.
- Mukhopadhyay R., Chatterjee S., Chatterjee B., Banerjee P., Guha A. 2005. Production of gluconic acid from whey by free and immobilized *Aspergillus niger*. *International Dairy Journal*. 15(3): 299-303.
- Orozco, M y Solarte, J. 2003. Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para obtención del ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa. Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Universidad Nacional de Colombia - Sede Manizales.
- Panesar P., Kennedy J., Gandhi D., Bunko K. 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*. 105(1): 1-14.
- Parra R.A. 2009. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía- Medellín*. 62(1): 4967-4982.
- Parra R.A. 2010. Review: Bacterias Ácido Lácticas: papel funcional en los alimentos. *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 8(1): 93-105.
- Plessas S., Bosnea L., Psarianos C., Koutinas A., Marchant R., Banat I. 2008. Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. *Bioresource Technology*. 99 (13): 5951-5955.
- Serna L., Rodríguez A. 2005a. Producción de ácido láctico por una mezcla de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus salivarius* en fermentaciones en discontinuo. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 7(1): 32-38.
- Serna L., Rodríguez A. 2005b. Producción biotecnológica de ácido láctico: Estado del arte. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5(1): 54-65.
- Serna L., Rodríguez A. 2007. Producción económica de ácido láctico utilizando residuos de cosecha y jugos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). *Agricultura Técnica*. 67(1): 29-38.
- Urribarrí L., Vielma A., Páez G., Ferrer J., Mármol Z., Ramones E. 2004. Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. *Revista Científica FCV-Universidad de Zulia*. 14(4): 297-302.
- Vázquez J., Murado M. 2008. Mathematical tools for objective comparison of microbial cultures: Application to evaluation of 15 peptones for lactic acid bacteria productions. *Biochemical Engineering Journal*. 39(2): 276-287.

# Faster autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in presence of nitrite, using inocula from Colombia

## Crecimiento rápido autotrófico de microorganismos anaerobios oxidadores de amonio en presencia de nitrito, usando inóculos de Colombia

Jaime Sánchez<sup>\*,\*\*</sup>, Janeth Sanabria<sup>\*\*</sup>, Mike Jetten<sup>\*\*\*</sup>

### Summary

Anammox is a nitrite dependent process, catalyzed by bacteria of the order *Brocadiales*. Anammox bacteria oxidize ammonia under anoxic conditions, with nitrite as electron acceptor producing dinitrogen gas. Here, we demonstrated the presence of anammox bacteria by enriched them in a SBR reactor, with anaerobic samples taken from the bottom of a pond used in primary wastewater treatment. The enrichment reached nitrogen (N) removal rates of nearly 1.92 kg N/m<sup>3</sup>/day. (The stoichiometry of the reaction matched previous anammox studies). The enriched bacterial communities were analyzed by Fluorescence In situ Hybridization (FISH), and showed a nearly 90% enrichment at the end of the experiment (day 90). As far as we know this is the first time that the anammox bacteria were enriched using Colombian inocula. The enrichment was achieved in relatively short time with high yields and have an excellent potential for application in wastewater treatment opening the opportunity to treat nitrogen-rich effluents by partial nitrification and anammox, thereby decreasing operational costs with respect to aeration (nitrification) and addition of organic electron donor (heterotrophic denitrification). This more sustainable treatment is a good alternative to control nutrient pollution in water bodies in tropical countries.

**Key words:** nitrogen cycle, advanced treatment, anammox, nitrification, nitrification, denitrification.

### Resumen

La oxidación anaerobia del amonio (anammox), es un proceso nitrato dependiente, catalizado por bacterias del filo *planc-tomicetes*. Estas bacterias oxidan el amonio en ausencia de oxígeno, con nitrito como aceptor de electrones produciendo nitrógeno molecular. En Colombia, demostramos la presencia de estas bacterias mediante el enriquecimiento de cultivos en reactores por lotes, con inóculos nativos, provenientes de muestras anaeróbicas tomadas del fondo de una laguna para el tratamiento primario de aguas residuales. El enriquecimiento logrado alcanzó remociones de nitrógeno (N), en el orden de 1.92 kg - N /m<sup>3</sup>/día (la estequiometría de la reacción estuvo acorde con estudios previos de anammox). La comunidad bacteriana enriquecida, se analizó mediante hibridación in situ con fluorescencia (FISH), y mostró que el enriquecimiento contenía aprox. 90 % de bacterias anammox al final del experimento (Día 90). Esta es la primera vez que en Colombia se logra el enriquecimiento de estas bacterias con inóculos locales, hasta nuestro conocimiento. El enriquecimiento fue alcanzado en relativamente corto tiempo con altos rendimientos y tiene un excelente potencial de aplicación en el tratamiento de aguas residuales, abriendo oportunidades para el tratamiento de efluentes ricos en nitrógeno mediante nitrificación parcial y anammox, disminuyendo los costos en los procesos de aireación (nitrificación) y en la de adición de donadores orgánicos (denitrificación heterótrofa). El uso de estos tratamientos más sostenibles es una buena alternativa para el control de contaminación por nutrientes en los cuerpos de agua, en países tropicales.

**Palabras clave:** Ciclo del Nitrógeno, Tratamiento avanzado, anammox, nitrificación, nitrificación, denitrificación

**Recibido:** noviembre 16 de 2013

**Aprobado:** mayo 2 de 2014

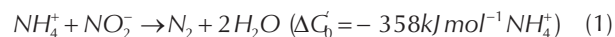
\* Departamento de hidráulica y sanitaria, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela

\*\* Laboratorio de Microbiología Ambiental, Escuela de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Universidad del Valle, Santiago de Cali, Colombia

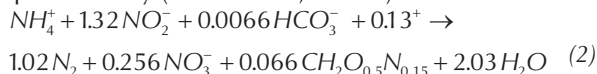
\*\*\* Department of Microbiology, Institute for Water and Wetland Research, Radboud University Nijmegen, Netherlands

## Introduction

The anaerobic ammonia oxidation (anammox) is a catabolic process expressed by the following reaction:



The full stoichiometry of the reaction was determined experimentally (Strous *et al.*, 1999a) as shown below:



The key factor for the enrichment of anammox bacteria was the use of mineral media for autotrophic growth with carbon dioxide, ammonia and nitrite, and an efficient system for retention of biomass (Strous *et al.*, 1998). Different types of anammox bacteria have been enriched from wastewater sludge (Kartal *et al.*, 2007b; Strous *et al.*, 1999a). The enriched anammox cultures allowed the development of molecular methods to detect anammox bacteria based on both 16S rRNA and functional genes. The cultures also allowed the determination of ecophysiological parameters (Kartal *et al.*, 2007a; Strous *et al.*, 1999b) as well as the identification of the unique ladderane lipids (Sinninghe-Damsté *et al.*, 2005). Furthermore the important enzymes for anammox catabolism were located in a special prokaryotic organelle (Van Niftrik and Jetten, 2012). Recently the molecular mechanism and key enzymes (Kartal *et al.*, 2011; Shimamura *et al.*, 2007) were identified involving hydrazine synthase and hydrazine dehydrogenase. Together with the more applied studies this allowed the industrial implementation of the anammox process for the treatment of high strength waste water (Jetten *et al.*, 1997). The doubling time for anammox bacteria is estimated at 11 days under optimal conditions, although shorter times of doubling have been recently reported in the literature (Isaka *et al.*, 2006; Tsushima *et al.*, 2007). The growth yield of these bacteria has been estimated at 0.07 mol C fixed / mol  $\text{NH}_4^+$  oxidized. This indicated that the slow growth is not caused by inefficient energy conservation but by the slow conversion of the substrate  $V_{\max} = 55 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$  (Jetten *et al.*, 1997; Khin and Annchhatre, 2004). The temperature maxima for most anammox bacteria are around 35 degree (Kartal *et al.*, 2007a), making them very suitable for application under tropical conditions.

The application of anammox to nitrogen removing systems reduces operating costs by 60% and the required space by 50% compared to traditional technologies, as well as  $\text{CO}_2$  emissions by 90% (Abma *et al.*, 2010; Kartal *et al.*, 2010). Other advantages are: no need for aeration, reduced sludge production given its low growth rate and it can remove over 5 to 6 times more nitrogen per cubic meter than the nitrification-denitrification process by stages (Gao and Tao, 2011; Innerebner *et al.*, 2007; Star *et al.*, 2007). The whole partial nitrification by Ammonia-oxidizing Bacteria (AOB) combined with anammox process is of great interest in effluents

of anaerobic digestion, which contain high amounts of nitrogen as ammonia.

Despite the extensive knowledge of these microorganisms, few studies have been performed, studying the ability of inocula in the tropics zone, which is particularly important given the potential of the diversity of this region.

In this paper, it was investigated the selection and finding of an appropriate local anammox inoculums as a precursor to the possible application for tertiary treatment of anaerobic effluents. The results showed the potential of using anammox in treating effluent from local anaerobic digesters.

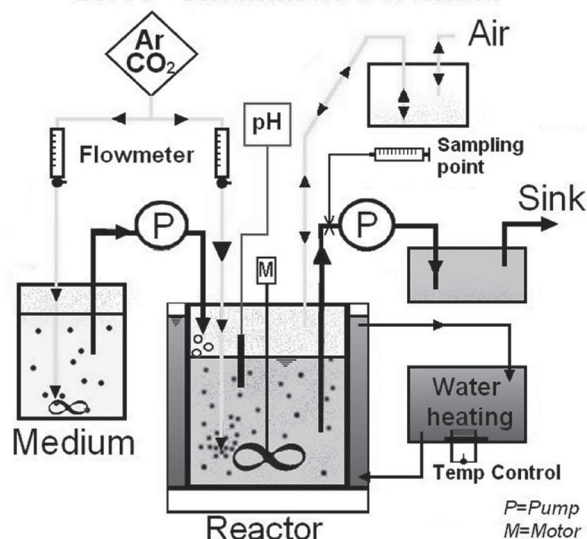
## Methodology

### Conditions for enrichment and reactor operation

The experiments were performed using a Sequential Batch Reactor (SBR), continuously fed (0.2 - 2 l/day) with one discharge point at the end of each cycle (see figure 1). The working volume was 5.2 l and minimum working volume was 3.2 l. The SBR was operated in cycles of 12 and 24 hours depending on the reload volume. To dispense the media a peristaltic pump was used with a capacity of 200 to 3000 ml/day, the speed of the pump (flow, ml/day) was adjusted depending on the consumption of nitrite in the reactor and the concentration of nitrite in the media. The reactor was home built, with clear acrylic material and silicone joints. Anoxic conditions were achieved by continuous addition of 20 ml/min of a gas mixture, composed by 95% Argon and 5%  $\text{CO}_2$ . The  $\text{CO}_2$  was also the carbon source for autotrophic growth, while contributing simultaneously to pH control.

The discharge took place after 10 minutes settling, allowing the efficient retention of biomass. The discharge volume corresponded to the amount of added medium, maintaining a minimum volume of 3.2 l. All the rate calculations were made based on the minimum volume. During each cycle a sample was taken for subsequent measurement of nitrite, nitrate and ammonia, by colorimetric methods while checking in situ concentration of nitrite with Merck® strips (Merckoquant®, Nitrite test, Merck-Germany). In case that no nitrite accumulated inside the reactor, the speed of the pump would be increased with a consequent augment in the medium supply, up to the maximum capacity. Once the maximum pump speed was reached, was redesigned the basal media while increasing ammonia and nitrite concentrations, and resetting medium supply to the minimum levels of the pump. Temperature was kept constant at 32° C, using a water jacket. The pH was continuously monitored with a glass membrane electrode with digital reader for pH and temperature and the pH was kept within the range of 7.2 to 7.9

## Dx IV - Anammox Colombia



**Figure 1.** Configuration of SBR reactor, continuous charge and punctual discharge, full mixing, heating system, gas feed, sampling point, continuous pH meter.

by adjusting the bicarbonate content in the media and the flow of the gas mixture.

### Medium composition

The media consisted of macro and micro nutrients, nitrite in the form of  $\text{NaNO}_2$  and ammonia in the form of  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  (2-60 mM), the concentration of nitrite and ammonia in the media was increased according to the microbial activity and the capacity of the feed pump. The media contained the following components per liter of distilled water:  $\text{KHCO}_3$  (0.5-1) g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mg;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.24 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.16 g; 1 ml of trace elements. The trace elements were added as described in Van de Graaf *et al.* (1996). The medium was kept anaerobic by adding  $\text{Ar}/\text{CO}_2$  95/5 % 10 ml/min continuously to the container.

### Inocula

Sample used as inoculum was taken from a sedimentation pond of a sugar mill, located in "Pradera" municipality, Valle del Cauca (Colombia). The water that feeds this lake originates from sugar cane washing liquid waste and industrial processing of sugar, after settling solids, water is recycled back to washing cane. The inoculum was collected from the bottom of the pond and they contained approximately 1 g/l of TVS (Total Volatile Solids). 1.2 liters of this inoculum was added, and diluted with 2 liters of medium.

### Nitrite, Nitrate and Ammonia

Nitrite was daily monitored by using colorimetric stripes (Merckoquant®, Nitrite test, Germany), with a range from 0 to 80 mg/l, in order to adjust the volume of substrate to provide, and to avoid accumulations higher to 20 mg/l. Ammonia and nitrite were weekly measured by colorimetry as described in Kartal *et al.* (2006). Nitrite was measured using spectrophotometers (UV-1800 Shimadzu®) as described in the standard methods 4500- $\text{NO}_3^-$  B (Greenberd *et al.*, 1994). Daily samples were kept in storage at  $-4^\circ\text{C}$ , defrosted and centrifuged for 30 min at 13.000 rpm for the corresponding measures.

### Molecular Studies

Samples of biomass (2 ml) were taken for DNA extraction and purification, according to the methodology described in Greenberd *et al.* (1994). Extracted DNA is used as template for polymerase chain reaction (PCR) as described previously in Schmid *et al.* (2005) with specific primers for the detection of anammox bacteria Pla46F (Neef *et al.*, 1998) and AMX368R (Schmid *et al.*, 2005) as well as for identification of general bacteria. Additionally, 2 ml of biomass are fixed in para-formaldehyde and hybridized as described in Schmidt *et al.* (2002), the probes used for hybridization were labeled with Cy3 and FAM (Fluorescein) purchased at Microsynth® (Switzerland). DNA was stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The probes for identification of anammox bacteria were: SP-Plan-0046-aA-18 (Pla46) for detecting planctomycetes, S\*-Amx-0368-aA-18 (Amx368) for detecting most anammox and S\*-Amx-0820-aA-22 (Amx820), and specific Kuenenia and Brocadia (Schmid *et al.*, 2000). EU-Bmix (mixed equimolar solution of EUB338, EUB338II and EUB338III) was used for the detection of most *Bacteria*, Ntspa and NIT3 (Egli *et al.*, 2003) for identifying nitrite oxidizing bacteria in equimolar solution we call NITRI mix. The samples were examined using a fluorescence microscope (Nikon®, Eclipse 90i), and photographs were taken with a digital camera (Nikon Digital Sight DS 2MBWc) and processed with specialized software (NIS-Elements). Extracted DNA is used as template for polymerase chain reaction (PCR). Pla46F and AMX368R specific primers for the detection of anammox bacteria were used.

### Results and discussion

The anammox bacteria enrichment is dependent on anoxic conditions and effective biomass retention. Therefore we took great care to use strictly anoxic mineral media, continuously bubbling the bioreactor with Argon/ $\text{CO}_2$  mixture, and applied a strict feed regime in the SBR system (see figure 2). Furthermore the pH value was kept between 7 and 7.8 and the temperature was  $32^\circ\text{C}$ . The start concentrations of ammonia



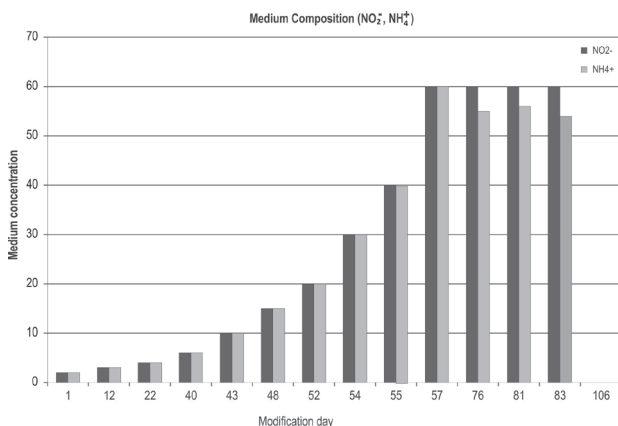
and nitrite were 2 mM to prevent toxicity at the start of the enrichment. The influent had a constant flow rate of 600 ml/day and cycles of 24 hours until nitrite was no longer detected in the effluent.

The conversion rates of ammonia and nitrite are shown in figures 3 and 4, respectively, and indicated an exponential removal from day 50 onwards.

The experiment was divided into 4 stages for its analysis: 0-15, 15-35, 35-60 and 60-90 days, according to: changes in the transformation of nitrite and ammonia, the ratio of removed nitrite/ammonia each day, the exponential variation of conversion rates and concentrations measured in the effluent.

During the first phase (days 0-15), the inoculum immediately started the consumption of substrates (nitrite and ammonia), so by day 15 of experimentation, up to 900 ml/day of media could be added. Concentrations of 3 mM of ammonia and nitrite respectively were in the medium at this point. To further increase the nitrogen load, we increased the concentration in the media whenever possible. Ammonia and nitrite accumulations in reactor were always 0.01 to 0.02 mM. The factors that could be attributed to this consumption are: the possibility of  $O_2$  incoming for nitrification during discharge time, and the presence of organic substrate from the inoculum for heterotrophic denitrification. Anammox bacteria were no detectable with FISH, meaning they could be there but in very low concentration (~10.000 cells/ml) (Amann et al., 1995).

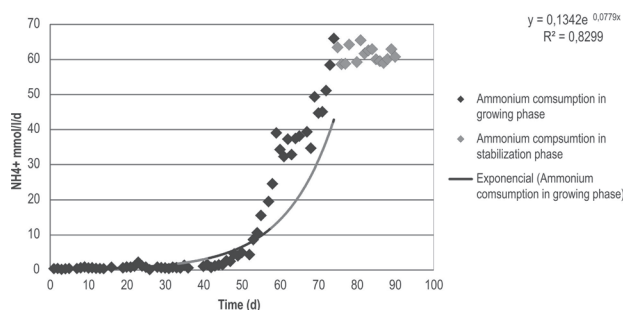
In the second period (day 15 to 35), we observed the nitrite/ammonia consumption ratio increased from 1 to 1.20, (see figure 4), implying a higher accumulation of ammonia inside the reactor, also absence of partial nitrification, associated with the presence of small amounts of oxygen. The  $O_2$  could be introduced during the discharge phase, therefore low concentration



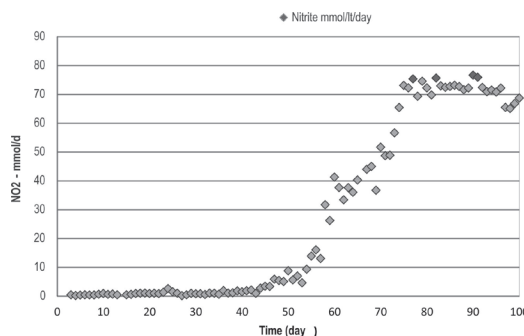
**Figure 2.** Ammonia and nitrite concentration changes during experimentation. Concentration gains on each component were calculated according to the growth in consumption or transformation thereof.

of nitrate (0.05 mM) in the effluent indicated that part of the nitrite was oxidized to nitrate, to supply the anammox bacteria with sufficient electrons for  $CO_2$  fixation (Strous et al., 2006).

For the third period of the experiment (days 35 and 60), we can see a fluctuation in the nitrite/ammonia ratio from 1.20 to 1.50 returning to 1.15. The presence of a small amount of nitrifying bacteria was confirmed by FISH (+/- 3%), which shows that some oxygen may still enter to the reactor during the discharge period. An increase in the consumption of nitrite in relation to ammonia was also detected (figure 4): conversion at a representative midpoint of the period (e.g. 54 days), were 33.9 mmol/day of ammonia and 44.4 mmol/day of nitrite. Thus the nitrite/ammonia ratio was 1.31 close to the expected value (Strous et al., 1998). Du-



**Figure 3.** Transformation of ammonium throughout the experiment. Dark diamonds: exponential phase. Lighter diamonds: stabilization phase. Line: Exponential curve  $Y = 0.1342 e^{0.0779x}$ . Each point represents the ammonia transformed every corresponding day, in moles per liter of reactor. Due to the graphic scale and broad ranges of consumption throughout the experiment, the consumption during the first 40 days ranging from 0.3 to 3mmol/l\*day is not accurately depicted. After day 70 the supplied ammonia was reduced and limited (avoiding accumulations in the reactor), while consumption remained relatively constant.



**Figure 4.** Nitrite conversion during the experiment. Through 0 to 40 day period consumption fluctuates from 0.6 to 4 mM (not displayed in the graph), after 40 days the growth of anammox is exponential and by day 80 consumption stabilizes.

ring this period, Plantomycetes (pla46 positive cells in FISH) were becoming, dominant in the community.

Finally, during the period between days 60 and 90, we observed an increasing production of nitrate (data not shown) in good accordance with the expected anammox stoichiometry of 0.26 mmol of nitrate per 1 mmol of ammonia (equation (2)) produced anaerobically.

During this period the anammox rate increased exponentially, indicating that the bacteria population doubled every 9 days (calculated from the exponential ammonium consumption growing). The nitrite/ammonia ratio stabilized in this period (60-90) at approximately 1.16.

In summary, the nitrite/ammonia ratio of anammox process is expected to be around 1.32 (equation (2)), meanings, for every mmol of ammonia 1.32 mmol of nitrite are required. Nitrite/ammonia ratios in our enrichment were always somewhat below 1.32 which could indicate that part of the ammonia was oxidized to nitrite and nitrate under limited oxygen by AOB and nitrite-oxidizing bacteria (NOB). Indeed about 3% of the cells in the community reacted with AOB and NOB specific probes.

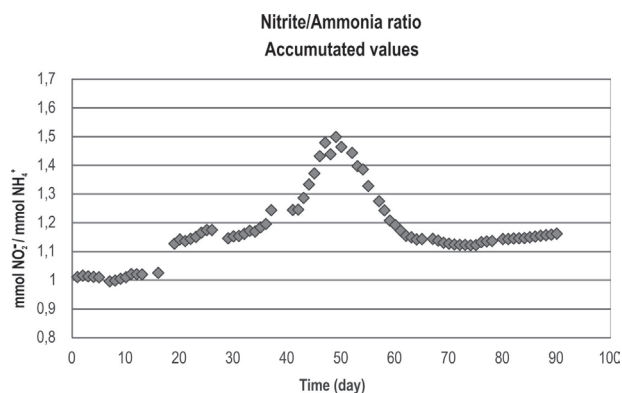
Results of ammonia removal rates (figure 3), show that after 50 days a substantial amount of ammonia and nitrite (figure 4) is removed by anammox bacteria. At 56 days we observed by FISH a 40 % of anammox presence (figure 6 and 7). At 90 days of enrichment, the community contained about 90% anammox bacteria, which is in good agreement with the ammonia and nitrite removal activity (245 mmol/day  $\text{NO}_2^-$  and 201 mmol/d  $\text{NH}_4^+$ ). Nitrite is assumed to be the limiting substrate in this experiment as ammonium amounts were provided in excess.

According to the anammox probes used for hybridization, a high proportion of anammox bacteria belong to the Brocadia and Kuenenia groups.

The PCR amplified fragments, for the detection of anammox, were tested by agarose gel (2%) electrophoresis and the band's size were between 300 and 400 bps as expected (322 bp, fig. 8) according with the 16s rRNA genes of anammox bacteria.

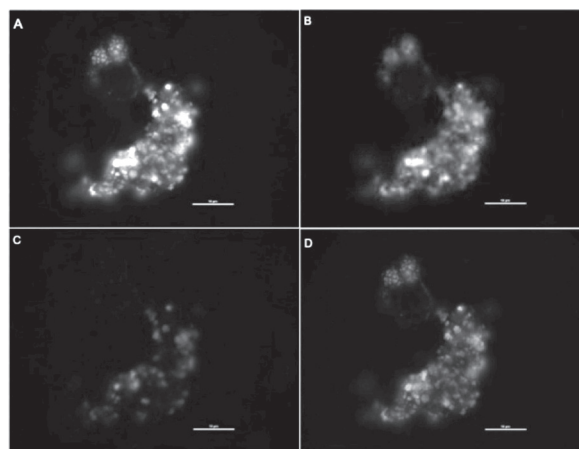
## Conclusions

The application of anammox processes, to achieve ammonia removal, requires a preceding partial nitrification step, in which approximately 55% of ammonia will oxidize to nitrite. Once this conversion is obtained, the anammox bacteria will convert the nitrite and ammonium into nitrogen gas. Complete autotrophic removal would greatly reduce aeration costs, the need to add electron donors and recirculation during conventional nitrification and denitrification. The present experiments show the enrichment of ammonia-oxidizing anaerobic bacteria in a remarkably short period of time, with a doubling time of about 9 days during



**Figure 5.** Nitrite transformation relation with respect to ammonium. Total values from day "0" representing changes in biomass conformation.

exponential growth. The presence of a local source of anammox bacteria opens the possibility of application of this novel process in Colombia and the surrounding tropics. During the experiment, we observed the presence of nitrifying bacteria inside the reactor at about 3% abundance, which would facilitate the processes of partial nitrification under oxygen limitation. The oxygen was most probably introduced during the discharge period, but was apparently rapidly consumed and resulted in some additional nitrite and nitrate production. This implies the possibility of developing co culture of anammox and AOB inside the same reactor under limited oxygen conditions similar to one step



**Figure 6.** Detection of Anammox and bacteria in general, using FISH: A) Superposition of all three hybridizations. In lighter color, anammox flocks interacting with the rest of the mixed population. The sample was taken and fixed on day 56, by this time the community was able to transform 101 mM of nitrite and 63 mM of ammonia per day. We estimate that 40% of microbial community corresponded to anammox observed in all wells. Scale bars 10 microns. B) DAPI, C) AMX 368 specific for all known Anammox bacteria (CY3). D) EUB-mix equimolar specific solution for most bacteria (FAN).

anammox or CANON systems (Sliekers *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2010).

The results presented above, are consistent with the presence of anammox in both terrestrial and aquatic systems. The successful enrichment of anammox from local Colombian sources has potential for the development of local treatment systems for nitrogen. The conversion rates reached over 2.1 kg N/m<sup>3</sup> \* day, high enough for an application in the tertiary treatment of industrial effluents, anaerobic digesters or secondary recirculation lines. Average temperatures in Valle del Cauca (Colombia) match the average temperature of the experiment, suggesting there is no need for heating nitrogen removing systems. Further research on the anammox process in Colombia is necessary and requires pilot scale experiments for final implementation in local treatment plants, thereby preventing the discharge of nitrogen compounds onto our natural water bodies.

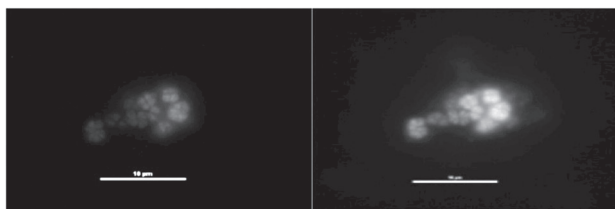
### Acknowledgements

This study was funded by the Environmental Microbiology Laboratory at Universidad del Valle, Cali, Colombia, and resources provided by the program to support PhD students of the Research Vice Presidency in UNIVALLE, and Universidad de los Andes (Venezuela). MSMJ by ERC 232937

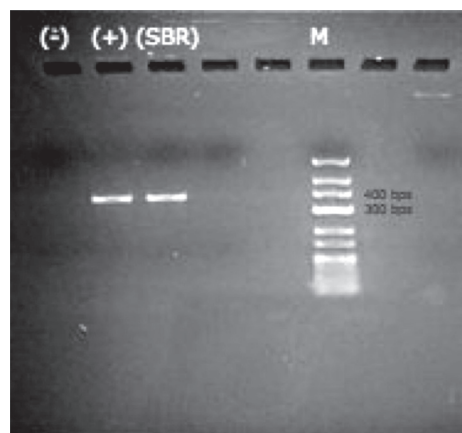
To Julien Wist for designing the body of the reactor, Julián Jiménez for his participation towards the construction and operation of the reactor, Mariela Lopez for FISH assays, Dany Acevedo and Alejandra Tobón for their assistance in PCR assays, Laurent Hafiz for the drawings. Jaime Sánchez was funded by the scholarship program at Universidad de los Andes, Merida, Venezuela..

### Bibliography

- Abma W.R., Driessen W., Haarhuis R., Van Loosdrecht M.C.M. 2010. Upgrading of sewage treatment plant by sustainable and cost-effective separate treatment of industrial wastewater. *Water Science and Technology*. 61(7): 1715-1722.
- Aiyuk S., Forrez I., Lieven D.K., Van Haandel A., Verstraete W. 2006. Anaerobic and complementary treatment of domestic sewage in regions with hot climates. A review. *Bioresource Technology*. 97(17): 2225-2241.



**Figure 7.** Day 52, A: CY3 hybridized with an equimolar solution, Nitri-mix represents nitrating groups, which require oxygen for the conversion of nitrite to nitrate. B: CY3 + DAPI, overlapping of the two emissions. Scale bars 10 micras.



**Figure 8.** Detection of Anammox using PCR from SBR reactor at day 80 of operation with specific primers for the detection of anammox bacteria Pla46F and AMX368R

- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. 1995. Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial-cells without cultivation. *Microbiological Reviews*. 59(1): 143-169.
- Egli K., Langer C., Siegrist H.R., Zehnder A.J., Wagner M., Van der Meer J.R. 2003. Community Analysis of Ammonia and Nitrite Oxidizers during Start-Up of Nitrification Reactors. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(6): 3213-3222.
- Gao D.W., Tao Y. 2011. Versatility and application of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91: 887-894.
- Greenberd A.E., Clesceri L.S., Eaton A.D. (Editors). 1994. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 18th edition. Alexandria, USA: American Public Health Association, 1025 pp. ISBN 0-87553-207-1.
- Innerebner G., Insam H., Franke-Whittle I.H., Wett B. 2007. Identification of anammox bacteria in a full-scale deammonification plant making use of anaerobic ammonia oxidation. *Systematic and Applied Microbiology*. 30(5): 408-412.
- Isaka K., Date Y., Sumino T., Yoshie S., Tsuneda S. 2006. Growth characteristic of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in an anaerobic biological filtrated reactor. *Applied Microbiology Biotechnology*. 70: 47-52.
- Jetten M.S.M., Horn S.J., van Loosdrecht M.C.M. 1997. Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system. *Water Science and Technology*. 35(9): 171-180.
- Kartal B., Koleva M., Arsov R., van der Star W., Jetten M.S.M., Strous M. 2006. Adaptation of a freshwater anammox population to high salinity wastewater. *Journal of Biotechnology*. 126(4): 546-553.
- Kartal B., Kuypers M.M., Lavik G., Schalk J., Op den Camp H.J., Jetten M.S., Strous M. 2007a. Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. *Environmental Microbiology*. 9(3): 635-642.
- Kartal B., Rattray J., van Niftrik L.A., van de Vossenberg J., Schmid M.C., Webb R.I., Schouten S., Fuerst J.A., Sinninghe-Damste J., Jetten M.S.M., Strous M. 2007b. Candidatus "Anammoxoglobus propionicus" a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*. 30(1): 39-49.
- Kartal B., Kuenen J.G., van Loosdrecht M.C.M. 2010. Sewage Treatment with Anammox. *Science*. 328(5979): 702-703.
- Kartal B., Maalcke W.J., de Almeida N.M., Cirpus I., Gloerich J., Geerts W., Op den Camp H.J.M., Harhangi H.R., Janssen-Mengers E.M., Francois K.J., Stunnenberg H.G., Keltjens J.T., Jetten M.S.M., Strous M. 2011. Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature*. 479(7371): 127-130.

- Khin T., Annchhatre A.P. 2004. Novel microbial nitrogen removal processes. *Biotechnology Advances*. 22(7): 517-532.
- Neef A., Amann R., Schlesner H., Schleifer K.H. 1998. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology*. 144 (12): 3257-3266.
- Schmidt I., Sliemers O., Schmid M., Cirpus I., Strous M., Bock E., Kuenen J., Jetten M.S.M. 2002. Aerobic and anaerobic ammonia oxidizing bacteria - competitor or natural partners?. *FEMS Microbiology Ecology*. 39(3): 175-181.
- Schmidt M., Twachtman U., Klein M., Strous M., Juretschko S., Jetten M., Metzger J.W., Schleifer K.H., Wagner M. 2000. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Systematic and Applied Microbiology*. 23(1): 93-106.
- Schmidt M.C., Maas B., Dapena A., van de Pas-Schoonen K., van de Vossenberg J., Kartal B., van Niftrik L., Schmidt I., Cirpus I., Kuenen J.G., Wagner M., Sinninghe-Damsté J.S., Kuypers M., Revsbech N.P., Mendez R., Jetten M.S.M., Strous M. 2005. Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(4): 1677-1684.
- Shimamura M., Nishiyama T., Shigetomo H., Toyomoto T., Kawahara Y., Furukawa K., Jujii T. 2007. Isolation of a multiheme protein with features of a hydrazine-oxidizing enzyme from an anammox enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(4): 1065-1072.
- Sinninghe-Damsté J.S., Rijpstra W.I.C., Geenevasen J.A.J., Strous M., Jetten M.S.M. 2005. Structural identification of ladderane and other membrane lipids of planctomycetes capable of anaerobic ammonium oxidation (anammox). *FEBS Journal*. 272(16):4270-4283.
- Sliemers A.O., Third K., Abma W., Kuenen J.G., Jetten M.S.M. 2003. CANON and anammox in a gas-lift reactor. *FEMS Microbiology Letters*. 218(2): 339-344.
- Strous M., Heijnen J.J., Kuenen J.G., Jetten M.S.M. 1998. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50(5): 589-596.
- Strous M., Fuerst J.A., Kramer E.H.M., Logemann S., Muyzer G., van de Pas-Schoonen K.T., Webb R., Kuenen J.G., Jetten M.S.M. 1999a. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*. 400(6743): 446-449.
- Strous M., Kuenen J.G., Jetten M.S.M. 1999b. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(7): 3248-3250.
- Strous M., Pelletier E., Mangenot S., Rattei T., Lehner A., Taylor M.W., Horn M., Daims H., Bartol-Mavel D., Wincker P., ..., Le Paslier D. 2006. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*. 440(7085): 790-794.
- Tsushima I., Ogasawara Y., Kindaichi T., Satoh H., Okabe S. 2007. Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors. *Water Research*. 41(8): 1623-1634.
- Van de Graaf A.A., De Bruijn P., Robertson L.A., Jetten M.S.M., Kuenen J.G. 1996. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*. 142 (8): 2187-2196.
- Van Niftrik L., Jetten M.S.M. 2012. Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria: Unique Microorganisms with Exceptional Properties. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 76(3): 585-596.
- Van der Star W.R., Abma W.R., Blommers D., Mulder J.W., Tokutomi T., Strous M., Picioreanu C., Van Loosdrecht M.C.M. 2007. Start-up of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Research*. 41(18): 4149-4163.
- Yan J., Op den Camp H.J., Jetten M.S., Hu Y.Y., Haaijer S.C. 2010. Induced cooperation between marine nitrifiers and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria by incremental exposure to oxygen. *Systematic and applied microbiology*. 33(7): 407-415.



# Identification, cloning and lactonase activity of recombinant protein of *N*-acyl homoserine lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis* 147-115-16 strain

## Identificación, clonación y actividad lactonasa de la proteína recombinante de *N*-ácil homoserina lactonasa (AiiA) de *Bacillus thuringiensis* cepa 147-115-16

Álvaro M. Florez<sup>\*†</sup>, Adriana González<sup>\*</sup>, Carmen J. Pedroza<sup>\*\*</sup>, Elizabeth Correa<sup>\*\*</sup>,  
Nohora J. Rueda<sup>\*</sup>, Sergio Orduz<sup>\*\*</sup>

### Abstract

The quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases are a family of bacterial metalloenzymes that participate in degradation of *N*-acyl homoserine lactones (AHLs), disrupting the quorum sensing system of gram negative bacterial species. From a collection of *Bacillus thuringiensis* strains isolated in Colombia from plants and exhibiting toxic activity against lepidopteran insects, 310 bacterial isolates were tested to determine lactonase activity by using biosensor systems in presence of synthetic *N*-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL) and *N*-octanoyl-L-homoserine lactone (C8-HSL). From them, 251 strains showed degrading activity to both C6-HSL and C8-HSL, 57% exhibited degrading activity to C6-HSL and 43% to C8-HSL. One *B. thuringiensis* strain, denoted as 147-115-16, that exhibit high degrading activity to C6-HSL and C8-HSL, was able to attenuate soft rot symptoms in infected potato slices with *Pectobacterium carotovorum*. This strain contains an homologous of the *aiiA* gene that was cloned, sequenced and expressed in *Escherichia coli* DE3. The recombinant protein AiiA<sub>147-11516</sub> display activity to C6-HSL, C8-HSL, *N*-( $\beta$ -ketocaproyl) (3-O-C6-HSL) and *N*-3-oxo-dodecanoyl (3-O-C12-HSL). The recombinant strain in the presence of *P. carotovorum* cultures was able to attenuate the infection, suggesting that it interferes either on the accumulation or response to the AHLs signals. According to this data and based on previous report from recombinant AiiA<sub>147-11516</sub>, this enzyme exhibit activity to wide range of catalytic substrates suggesting its industrial application in the disease control programs by plants transformation.

**Key words:** lactones, Quorum sensing, Quorum quenching, Lactonases, *Pectobacterium carotovorum*

### Resumen

Las *N*-ácil homoserina lactonasas son una familia de metaloenzimas bacterianas que participan en la degradación de *N*-ácil homoserina lactonas (AHLs) interrumpiendo el sistema de detección de quórum sensing de bacterias Gram negativas. A partir de una colección de cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas del fitoplasma de plantas colombianas que presentaron actividad tóxica contra insectos lepidópteros, 310 fueron probadas para determinar actividad lactonasa mediante el uso de sistemas de biosensores en presencia de *N*-hexanoilo-L-homoserina lactona (C6-HSL) y la *N*-octanoilo-L-homoserina lactona (C8-HSL) sintéticas. De estas cepas, el 251 mostraron actividad para ambas lactonas y de estas, el 57% mostró actividad a C6-HSL y el 43% a C8-HSL. Una cepa de *B. thuringiensis* denominada 147-115-16 que mostró alta actividad para C6-HSL y C8-HSL, fue capaz de atenuar los síntomas de la pudrición blanda en rodajas de papa infectadas con *Pectobacterium carotovorum*. Esta cepa contiene un gen homólogo a *aiiA*, el cual este fue clonado, secuenciado y expresado en *Escherichia coli* DE3. La proteína recombinante AiiA<sub>147-11516</sub> exhibe actividad para C6-HSL y C8-HSL, así como para *N*-( $\beta$ -cetocaproil) (3-O-C6-HSL) y *N*-3-oxo-dodecanoil (3-O-C12-HSL). La cepa recombinante en presencia de *P. carotovorum* fue capaz de atenuar la infección, sugiriendo que interfiere con la acumulación o respuesta de las señales AHLs. Según estos datos y

\* Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto MASIRA, Facultad de Salud, Universidad de Santander, UDES, Bucaramanga, Santander, Colombia.

\*\* Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Medellín, Colombia.  
Correspondence author amflores@udes.edu.co. Phone +57 6516500 Ext. 1375. Fax: +57 6516492

basados en el reporte previo sobre la actividad hidrolítica de la proteína recombinante AiiA<sub>147-11516</sub>, esta enzima posee un actividad contra un amplio número de sustratos lo cual sugiere su aplicación en la industria en el control de enfermedades, mediante la transformación de plantas.

**Palabras clave:** Lactones, Quorum sensing, Quorum quenching, Lactonases, *Pectobacterium carotovorum*.

**Recibido:** octubre 25 de 2013

**Aprobado:** mayo de 2014

## Introduction

In the majority of gram negative bacteria quorum sensing is mainly mediated by signaling cascades, involving *N*-acyl-homoserine lactones (AHLs) (Von Bodman et al., 2003). AHLs contain a common homoserine lactone ring, differing in their carbon length (4 to 18 carbons), degree of saturation, and the presence of C3 acyl chain modifications. AHLs are multifunctional molecules that when they accumulate regulate relevant functions during bacterial growth such as production of extracellular enzymes, bioluminescence, biofilm formation, and coordinate cellular activities associated with host pathogen interactions (Atkinson and Williams, 2009; Williams and Camara, 2009). Many bacterial species, such as *Pectobacterium carotovorum*, are highly pathogenic to plants by triggering the expression of virulence factors via quorum sensing (QS) (Williams, 2007). *P. carotovorum* is an etiologic agent of soft rot disease in a wide variety of cultivated plants (Charkowski, 2009). This bacterium regulates the production of different exoenzymes by secreting AHLs, including *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (3-O-C6-HSL) and *N*-(3-oxooctanoyl)-L-homoserine lactone (3-O-C8-HSL) (Jones et al., 1993; Pirhonen et al., 1993; Cha et al., 1998; Smadja et al., 2004; Chatterjee et al., 2005; Liu et al., 2008). The role of QS in *P. carotovorum* pathogenicity have been reviewed (Barnard et al., 2007).

In contrast, there are microorganisms acting as antagonists of QS by producing signal interference mechanisms known as quorum quenching (QQ), (Kalia, 2013) mediated by AHL-degrading enzymes. There are two families of QQ enzymes, lactonases and acylases. The lactonase family cleaves the lactone ring of AHLs releasing *N*-acyl homoserines, which are not recognized as a QS signal, some examples include AiiA from *Bacillus* sp., AttM from *Agrobacterium tumefaciens* strain A60, AiiB from *A. tumefaciens* strain C58 (Carlier et al., 2003; Dong et al., 2000) and AhlD from *Arthrobacter* sp. (Park et al., 2003). Acylases are known to be capable of cleaving the acyl bonds and releasing a homoserine lactone ring (Lin et al., 2003; Sio et al., 2006), some representative enzymes are AiiD from *Ralstonia* XJ12B, and PvdQ from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. After the cleavage of the AHLs molecules, the released products become more soluble in water, making them an available nutrient source to the surrounding microorganisms, like *Variovorax paradoxus*

(VAI-C), which is capable of using AHLs as a sole nutrient source (Leadbetter and Greenberg, 2000).

Production of QQ *N*-acyl homoserine-lactonases was first reported in a strain of the genus *Bacillus* sp. (Dong et al., 2000; Dong et al., 2004). It was also reported in *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus* and *B. mycoides* (Dong et al., 2002; Lee et al., 2002). The first AHL-lactonase that was completely characterized was AiiA<sub>240B1</sub> and it was found that belongs to the metallo- $\beta$ -lactamase family based on the presence of a HXHXDH motif, and an identical Zn<sup>2+</sup> binding motif (Dong et al., 2000). This enzyme has the ability to inactivate AHLs with different acyl chain lengths and substitutions at the C3 position, including *N*-butyryl-L-homoserine lactone (C4-HSL), 3-O-C6-HSL, 3-O-C8-HSL, and 3-O-C12-HSL (Dong et al., 2001).

The second AHL-lactonase (AiiA<sub>BTK</sub>) reported was isolated from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, and work on a wider range of AHLs substrates, with maximum activity towards C10-HSL. This enzyme contains two Zn<sup>2+</sup> ions into the active site and possesses the same conserved residues present in all AHL-lactonases whose activity depends in metal coordination (Kim et al., 2005). For both characterized enzymes, AiiA<sub>240B1</sub> and AiiA<sub>BTK</sub>, important differences in the affinity for metal ions under chelating agents have been described (Wang et al., 2004; Kim et al., 2005; Thomas et al., 2005).

Based on that there is widespread existence of AHL-lactonases in *B. thuringiensis* (Dong et al., 2002; Lee et al., 2002), and in Colombia more than 600 *B. thuringiensis* isolates have been characterized looking for insecticidal activity (Uribe et al., 2003; Jara et al., 2006; Armengol et al., 2007), we aimed at isolating AHL degrading from a *B. thuringiensis* collection obtained from Colombian phyloplane. In this study we screened a *B. thuringiensis* collection and described the cloning, sequencing and the activity of recombinant protein of a *N*-acyl homoserine lactonase from *B. thuringiensis* <sub>147-11516</sub>.

## Materials and methods

### Bacterial strains and growth conditions

Two different AHL biosensors strains were used to detect AHL-lactonase activity, *Chromobacterium violaceum* CVO26 (mini Tn5 mutant of 31532) (McClellan et al., 1997; Winson et al., 1998) and *A. tumefaciens* NTL4 *tral-lacZ* fusion (pCF218) (pCF372) (Fuqua et al.,

1994). *C. violaceum* CVO26 was grown in LB medium (1% peptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) solidified with 1.2% agar, and supplemented with kanamycin (20 µg/ml) (Invitrogen®). *A. tumefaciens* NTL4 was grown in AT minimal salts medium as was described in Tempé *et al.* (1977), at 30°C, supplemented with tetracycline 4.5 µg/ml (Sigma-Aldrich®), spectinomycin 50 µg/ml (Sigma-Aldrich®) and 40 µg/ml of X-gal (Promega®). *Escherichia coli* ArticExpress (DE3) cells were used for cloning and expression and were cultured at 37°C in LB medium supplemented with 100 µg/ml of ampicillin (Sigma-Aldrich®). *B. thuringiensis* strains were cultured in LB medium at 30°C in agar plates and broth.

Plant material with symptoms of soft rot disease were selected in order to isolate bacterial plant pathogens as described (Pérombelon and Kelman, 1980). Samples were taken from affected zones from lettuce (*Lactuca sativa* var. Batavia), calla lily (*Zantedeschia aethiopica* var. Spreng), potato (*Solanum tuberosum* var. Diacol capiro) and lulo (*S. quitoense* var. Castilla), and processed according to phytopathological methods (Agrios, 2005). Different bacterial colonies were obtained in nutrient agar from serial dilutions of macerated tissues. The isolated colonies were grown in D-3 selective medium for *P. caratovorum* (Kado *et al.*, 1970). Complementary tests for species identification were carried out as described (Schaad *et al.*, 2001).

### ***B. thuringiensis* AHL-lactonase activity**

AHL-lactonase activity was evaluated in 310 *B. thuringiensis* isolates as described by Lee *et al.* (2002), with some modifications. A culture of each *B. thuringiensis* strain was grown overnight until reaching an optical density of 1.1 at 600 nm. Then, 20 µM of synthetic C6-HSL and C8-HSL (Sigma-Aldrich®) were added independently into each culture and the reaction mixture was incubated at 30°C with shaking during 30, 60 and 120 min. Bacterial cells were centrifuged at 3000 x g for 10 min and the supernatants corresponding to each incubation time and to each *B. thuringiensis* strain were heated for 3 min at 95°C and placed into petri dishes with 10 wells with LB medium or AT agar containing an agar-suspension culture of the biosensor strain. These plates were incubated for 24 h at 30°C. The AHL-lactonase activity was evaluated at different times by measuring the diameters of the colored areas surrounding the wells in CVO26 (purple) and NTL4 (blue). Based on the sizes of the colored areas, a scale was designed; diameters between 0.0 and 0.39 cm<sup>2</sup> were assigned with (+++) indicating *B. thuringiensis* strains displaying high AHL-lactonase activity; between 0.4 and 0.74 cm<sup>2</sup> were assigned with (++) indicating a moderate activity; and between 0.75 and 0.89 cm<sup>2</sup> were assigned with (+) indicating a low activity. Finally, diameters larger than 0.9 cm<sup>2</sup> were considered without AHL-lactonase activity. Only the *B. thuringiensis* strains that exhibit high AHL lactonase activity (+++) to each

substrate to either C6-HSL or C8-HSL at 30, 60 and 120 min or 60 and 120 min were reported.

### **Screening of AHL production by *P. caratovorum***

The plant pathogenic bacterium *P. caratovorum* was streaked in parallel to the biosensor strains in LB agar for CVO26 and in the same way for NTL4 but in AT medium supplemented with 50 µg X-gal (Ravn *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2011), and plates were incubated for 24 h at 30°C. To evaluate the presence of AHLs, CVO26 was streaked on LB agar supplemented with C6-HSL, because its sensor system is inhibited by long acyl chain molecules. For this last assay, all plates with CVO26 were incubated for 24 h at 30°C for production of purple pigment, and then plates were re-incubated at 30°C for 24 h in order to evaluate inhibition of pigment formation.

### **In vitro control of soft rot symptoms**

To evaluate the effect of AHL-lactonase activity of *B. thuringiensis* on *P. caratovorum* infection, potatoes (*S. tuberosum* var Diacol Capiro) were washed with tap water and treated as described Dong *et al.* (2004). Five mm thick potato slices were dipped in a *B. thuringiensis* 12 hr culture containing 2x10<sup>7</sup> CFU/ml for 20 s and then were air dried in a laminar flow cabinet for 20 min. Then, three streaks were made on the surface of the slices and inoculated with 2.5 µl of cell culture media containing 1x10<sup>5</sup> UFC/ml of an *P. caratovorum* suspension isolated from potato. Each slice was placed in a petri dish in a humid chamber at 30°C. Disease symptoms were evaluated after 24 and 48 h of treatment. Each treatment was performed in quadruplicate. Based on the severity of the soft rot symptoms produced in the potato slices, a scale was developed to qualify the effect of *B. thuringiensis* on the disease caused by *P. caratovorum*. Absence of soft rot was assigned with (-), presence of small soft rot area and little wet was considered with (+), presence of moderate soft rot area, dark and wet was considered with (++) and, presence of high soft rot area, very dark and very wet was considered with (+++).

### **Cloning and sequencing of the *aiiA* gene**

The *B. thuringiensis* strain displaying greater AHL-lactonase activity with the biosensor strains *A. tumefaciens* NTL4 and *C. violaceum* CVO26 and the best control of *P. caratovorum* pathogenicity was selected and its DNA was extracted (Ceron *et al.*, 1995). Using PCR the *aiiA* gene was amplified with the following primers: 5' ATCGGATCCATGACAGTAAAGAAGCTTTATTTCG3' and 5' GTCGAATTCCTCAACAAGATACTCCTAATGATGT3' designed according to the *aiiA* sequences previously reported (Dong *et al.*, 2002). Amplification conditions were: denaturation at 94°C for 3 min followed by 28



cycles at 94°C for 30 s, 50°C for 30 s, and 72°C for 1 min in a MJ Research Thermocycler (Bio-Rad®). The amplified fragments were purified with a QIAquick PCR purification system (Qiagen®) and cloned into pGEM-T vector (Promega®). Clones were selected in LB media supplemented with IPTG (40 µg/ml) (Invitrogen®), X-gal (40 µg/ml) (Invitrogen®) and ampicillin (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich®). The gene was sequenced in both strands and the results were analyzed using Blastn, Blastp and ClustalW algorithm in Bioedit (Hall, 1999). The similarity and identity analyses were performed using MatGat (Campanella et al., 2003), and evolutionary relationships between AHL-lactonases were done using MEGA5 (Tamura et al., 2011).

The subcloning into the expression vector pCold IV (Takara-BIO-INC®), gene expression and protein purification are described by Pedroza et al. (2014).

### **Homology and phylogenetic dendrogram of AHL-degrading enzyme**

The similarity and identity analyses were performed using MatGat (Campanella et al., 2003), and evolutionary relationships between AHL-lactonases were done using MEGA5 (Tamura et al., 2011). The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining Method (Saitou and Nei, 1987). The optimal tree with the sum of branch length was = 0.34721705. The tree was drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood Method (Tamura et al., 2004) and are in the units of the number of base substitutions per site. The analysis involved 22 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 570 positions in the final dataset.

### **AHL-lactonase activity of recombinant *E. coli* DE3**

The recombinant *E. coli* DE3 containing the expression cassette pColdIV-AiiA was grown at 37°C in LB broth with ampicillin (50 µg/ml) at 200 rpm. After 5 hours of growth (O.D. 600 nm = 0.83), the IPTG (3.2 mM) was added and the incubation was continued overnight to reach an O.D. of 2.6 at 600 nm (Zhang et al., 2007). The cell culture was divided in several fractions in order to determine the AHL-lactonase activity. The first and second fractions were added each to LB medium in presence of 100 µM of synthetic C8-HSL and C6-HSL, the third and fourth fractions were added to LB medium in the presence of 100 µM of synthetic 3-O-C6-HSL and 3-O-C12-HSL, respectively. The fifth fraction was co-inoculated with 20 µl of a *P. caratovorum* culture (OD<sub>600</sub> = 0.8) in 5 ml of LB media. All the fractions were incubated at 37°C for 18 h at 200 rpm. The experiments included *B. thuringiensis* 147-11516, as positive control and *E. coli*

DE3 strain and *P. caratovorum* alone as negative control. Once the incubation time was finished each culture was centrifuged at 5800 x g during 10 min at 21°C and the supernatants were collected. Six lines were made with a sterile blade on each petri dish containing either LB media for CV026 strain or AB media with X-gal for NTL4 strain. Each line was 1 cm wide and 3 mm apart. Five µl of each supernatant was served in one end of each groove, and the samples were allowed to dry, and then each respective reporter strain was streaked. The petri dishes were incubated at 30°C for 24 hours. To determine the pigment produced by the reporter strains, the length was measured and the reproducibility was determined by 20 replicates.

### **Statistical Analysis**

Data was analyzed by using the ANOVA test. The confident values were set at 95%.

### **Results**

#### ***B. thuringiensis* AHL-inactivating activity**

Inactivation of AHLs by *B. thuringiensis* strains is considered effective when in a given evaluation period, the size of the colored area decreases with the time. When no color is observed at the first time of evaluation (30 min), the strain is listed as a candidate for *in vitro* pathogenicity inhibition assays. From the 310 *B. thuringiensis* strains isolated from phylloplane plants tested, 251 showed AHL-lactonase activity with C6-HSL and C8-HSL; C6-HSL was degraded by 57% of the *B. thuringiensis* strains, while C8-HSL was inactivated by 43% of the *B. thuringiensis* strains. *B. thuringiensis* strains that exhibit strong AHL lactonase activity against C6-HSL and C8-HSL are shown in table 1. The screening to these strains using CV026 in are shown in figure 1. The detectable concentration of the reporter strains was between 100-120 µM of AHLs.

#### **Effect of *B. thuringiensis* cultures on soft rot symptoms caused by *P. caratovorum***

To test the attenuation of soft rot symptoms, *B. thuringiensis* strains displaying the highest AHL-lactonase activity according to the results with the bio-sensor strains were selected. The plant pathogen *P. caratovorum* isolated from potato was used in these assays and its pathogenicity was evaluated on potato slices showing severe tissue maceration. When potato slices were pretreated with *B. thuringiensis* suspension (2x10<sup>7</sup> UFC/ml) before inoculation with *P. caratovorum*, the soft rot symptoms were considerably less severe compared with the soft rot produced on slices without previous treatment. According to the evaluation scale of soft rot symptoms, the strain *B. thuringiensis*<sub>147-115-16</sub> displayed the highest



efficiency inhibiting *P. carotovorum* pathogenicity (figure 2).

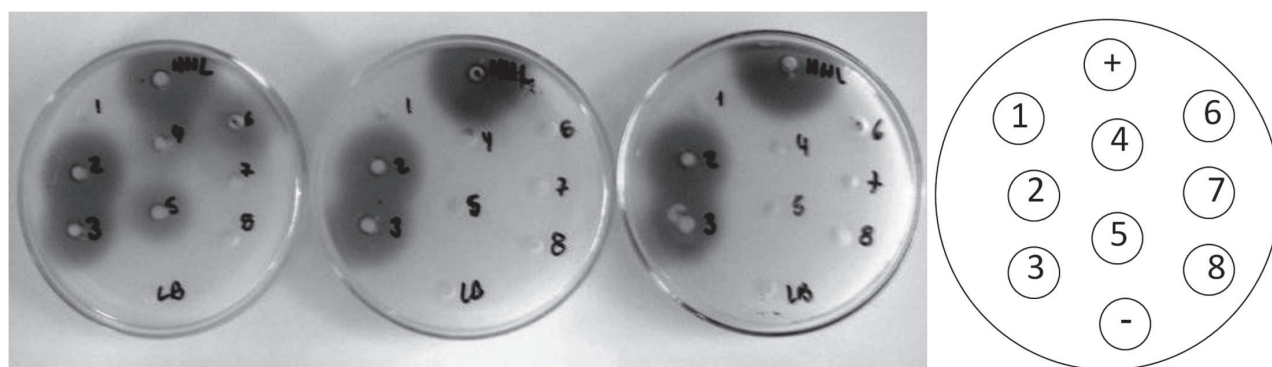
### Cloning and sequence analysis of the AiiA gene

*B. thuringiensis*<sub>147-11516</sub> strain displayed the best results in the biosensor assays, as well as in the *in vitro* pathogenicity assays; therefore, it was selected for molecular characterization. The length of expected amplified PCR product containing the gene coding *AiiA* was around 820 bp. Several clones that showed this length, exhibit a 754 bp ORF with sequence homology to *aiiA* genes reported in GenBank. The DNA sequence of *B. thuringiensis*<sub>147-11516</sub> gene was reported in GenBank with accession number EF379241. Comparison of the *B. thuringiensis*<sub>147-11516</sub> *AiiA* gene with other *AiiA* genes revealed maximum identity in the nucleic acid sequence between 93% to 99%. The dendogram show that *aiiA* gene of *B. thuringiensis*<sub>147-11516</sub> is most similar to *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* and *indiana* (figure 3). At protein level three conserved domains in the protein *aiiA* of the *B. thuringiensis*<sub>147-11516</sub> were detected by BLAST CD search of Conserved Domain Database

(rpsblast; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>; domain COG0491GloB, Zn dependent hydrolases, including glyoxylases (residues 78-250); domain pfam00753, the lactamase- $\beta$  domain, metallo-beta-lactamase superfamily (residues 33-235); and domain COG1237, metal dependent hydrolases domain of the  $\beta$  lactamase superfamily (residues 22-161). Using MEME and MAST programs (Bailey and Gribskov, 1998), in which protein sequences are analyzed for similarities among hydrolases, three motifs were also found in *B. thuringiensis*<sub>147-11516</sub> *AiiA*: motif 1 (residues 11-60); motif 2 (residues 76-125), and motif 3 (residues 128-177). These motifs of the *AiiA* are also present in the three Zn-dependent hydrolases.

### Recombinant *E. coli* DE3- pCold-AiiA shown lactonase activity

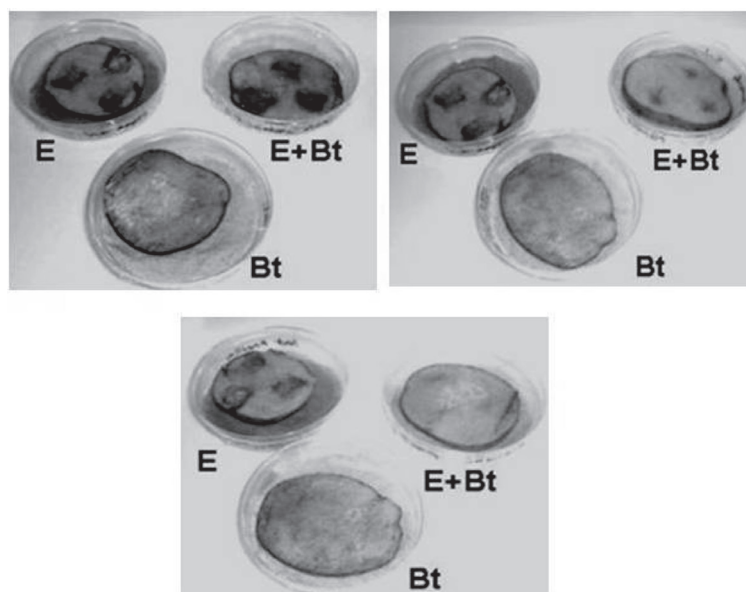
The lactonase activity of the recombinant *E. coli* DE3 was tested with synthetic lactones, C8-HSL and C6-HSL in the presence of the reporter strains CV026 and, with 3-O-C6-HSL and 3-O-C12-HSL in the case of NTL4. The results showed lack of purple pigmentation of strain



**Figure 1.** *C. violaceum* CVO26 with C6-HSL (HHL) as substrate. Well (+), reaction buffer with C6-HSL (20  $\mu$ M); well (-), reaction buffer only.

**Table 1.** AHL-lactonase activity of eight *B. thuringiensis* strains determined by biosensor strains. **A:** *C. violaceum* CVO26 with C6-HSL as substrate. Well (+), reaction buffer with C6-HSL (20  $\mu$ M); well (-), reaction buffer only.

Well number	Strain	Phylloplane origin	Evaluation time		
			30 min	60 min	120 min
1	147-11516	<i>Phaseolus vulgaris</i>	+++	+++	+++
2	146-17202	<i>Piper glanduligeron</i>	-	-	-
3	146-15505	<i>Piper calceolarium</i>	-	-	-
4	147-0206	<i>Zea mays</i>	+	+++	+++
5	146-16312	<i>Piper crassinervium</i>	+	+++	+++
6	146-16702	<i>Piper danielgonzalezi</i>	-	+++	+++
7	146-15533	<i>Piper calceolarium</i>	+++	+++	+++
8	147-12003	<i>Zea mays</i>	+++	+++	+++



**Figure 2.** Attenuation of *P. carotovorum* pathogenicity by AHL-lactonase activity of *B. thuringiensis*. (E) Potato slice inoculated with *P. carotovorum* alone, (E+Bt) potato slice pre-treated with *B. thuringiensis* and inoculated with *P. carotovorum*, (Bt) potato slice pre-treated with *B. thuringiensis* suspension only. **A.** No control of *P. carotovorum* symptoms by strain *B. thuringiensis*<sub>146-17202</sub>, **B.** Moderate control of *P. carotovorum* symptoms by strain *B. thuringiensis*<sub>146-16702</sub>, **C.** Total control of *P. carotovorum* symptoms by strain *B. thuringiensis*<sub>147-11516</sub>.

CV026 (figure 4) and in the case of NTL4, exhibit lack of blue pigmentation. In the presence of the pathogen *P. carotovorum*, the QQ signals were disrupted (figure 4A, lane 2 and 4B lane 1).

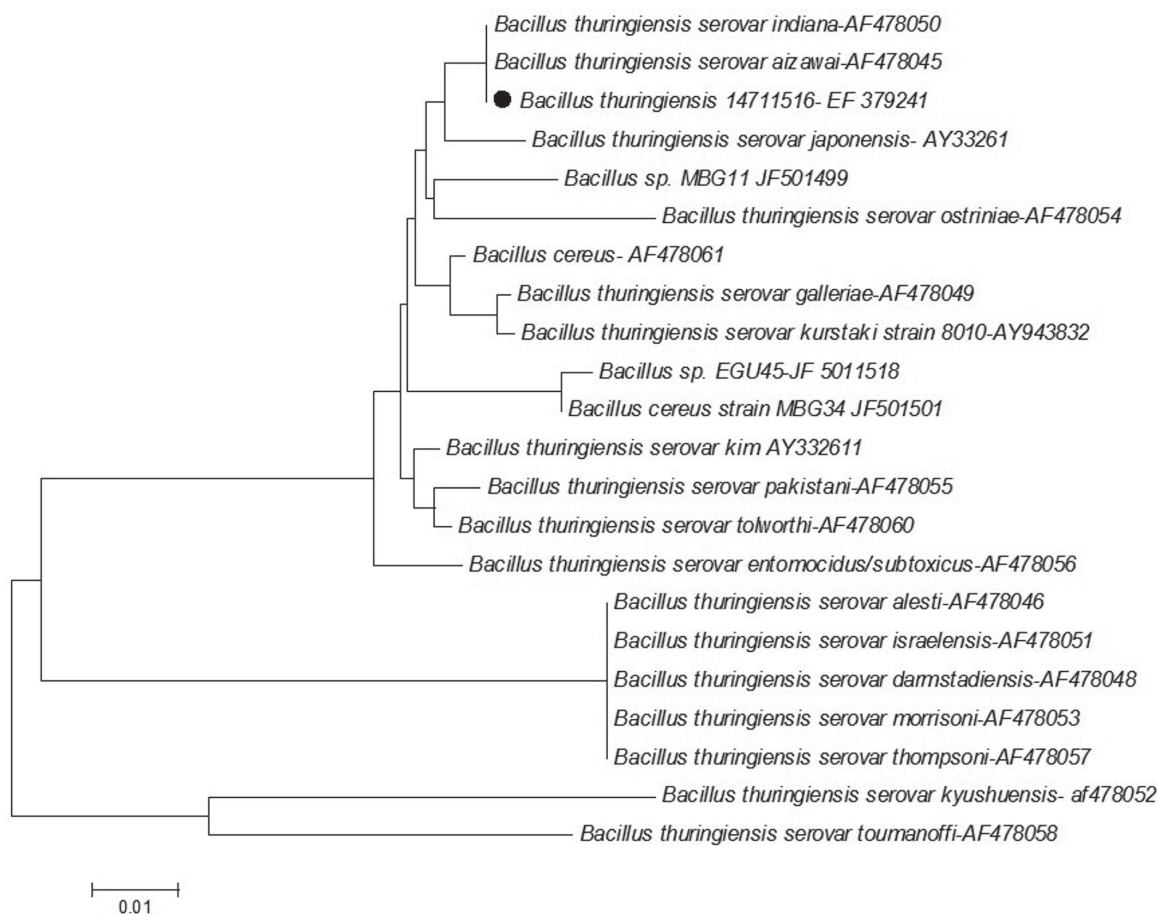
In all the cases, disruption of QS by the recombinant *E. coli* DE3, is shown by the lack of pigmentation in the presence of biosensor strains in comparison with the control, with the pathogen alone, which exhibits pigment production in response to both, long and short chain lactones. ANOVA analysis showed statistically significant differences between lactones indicating the preference to short chain than those that exhibit long-chain oxo substitutions. There was no statistical difference within the same group of lactones (figure 5). These results demonstrated the preference of recombinant AiiA<sub>147-11516</sub> for C8-HSL and C6-HSL.

## Discussion

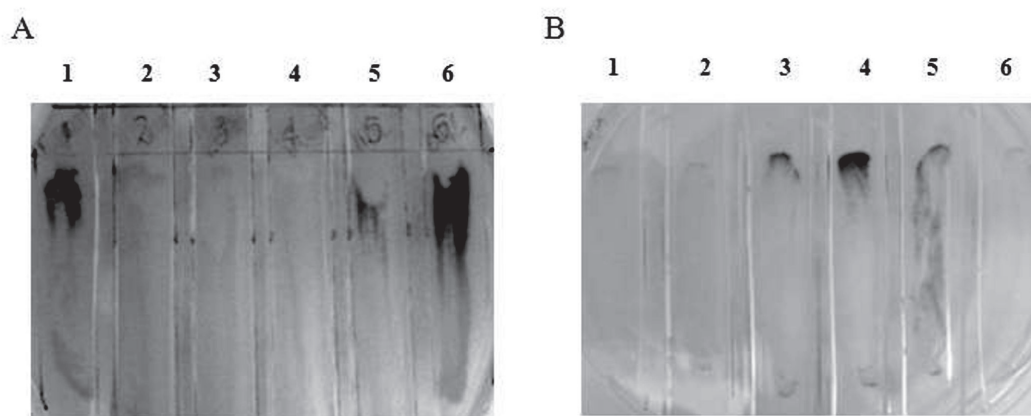
*N*-acyl homoserine lactones are signaling molecules that are inactivated by the enzyme AHL-lactonase by hydrolyzing the lactone ring, and in consequence, inhibiting the virulence of gram negative pathogens such as *P. carotovorum* (Dong et al., 2004). In this study, the strain *B. thuringiensis*<sub>147-11516</sub> isolated from the phylloplane of Colombian plants, was found to display attenuation of *P. carotovorum* symptoms in potato bioassays.

It has been established that the potential of some *B. thuringiensis* strains to attenuate infections depends on

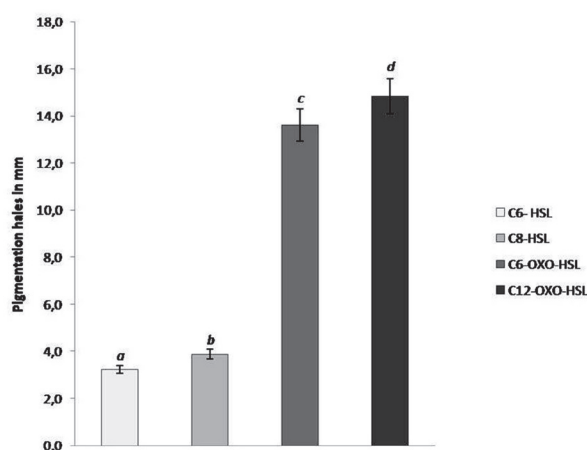
breaking down AHL molecules that contain different acyl side chain lengths (Lee et al., 2002). In this study, two synthetic AHLs with different acyl chain lengths, C6-HSL and C8-HSL, were inactivated by *B. thuringiensis*<sub>147-11516</sub> detected by the biosensor strains *A. tumefaciens* NTL4 and *C. violaceum* CV026. The biosensor strain NTL4 showed blue color as response in the presence of AHLs produced by *P. carotovorum*. In the *in vitro* assays using pretreated potatoes slices with *B. thuringiensis*<sub>147-11516</sub> cultures, attenuation of the soft rot symptoms caused by *P. carotovorum* were observed, which could suggest an interference of the *B. thuringiensis*<sub>147-11516</sub> AiiA towards AHL signaling molecules produced by *P. carotovorum*. This signaling molecules including those that have been reported to *P. carotovorum* such as 3-oxo substitutions in the acyl chain (Chatterjee et al., 2005), have been reported as a main regulators of extracellular enzymes involved in potato infection and responsible for symptoms development (Jones et al., 1993; Pirhonen et al., 1993). The *B. thuringiensis*<sub>147-11516</sub> strain contains also the *aiaA* gene that encodes a AiiA protein with a molecular weight of approximately 28,2 kDa, which is similar to the predicted molecular mass of 28,036 Da of the protein reported by Dong et al. (2000). The amino acid sequence alignments showed identities of 90.8% to 99.6% to other AHL-lactonases described (Lee et al., 2002). The evolutionary distances used to infer a phylogenetic tree confirm the wide distribution of *aiaA* homologous genes in *B. thuringiensis* subspecies and individuals and with identities above 93%. At protein level it was also observed the region



**Figure 3.** Phylogenetic dendrogram of AHL-degrading enzymes constructed using the neighbor-joining method. The bar indicates 1% estimated sequence divergence and the black circle highlight *B. thuringiensis*<sub>147-11516</sub>



**Figure 4. A.** Attenuation activity of AiiA using the reporter strain CVO26. Lane 1. Pathogen *P. carotovorum*; Lane 2: Recombinant strain (DE3) co-inoculated with *P. carotovorum*; Lanes 3 and 4: wild type strain *B. thuringiensis*<sub>147-11516</sub> co-inoculated with *P. carotovorum*; Controls: Lane 5: C6-HSL in the presence of CV026; Lane 6: C8-HSL in the presence of CV026 reporter strain. **B.** Attenuation activity of AiiA using the reporter strain NTL4 in the presence of AHL. Lane 1. Recombinant strain DE3 co-inoculated with the pathogen *P. carotovorum*; Lane 2: Recombinant strain (DE3); Lane 3: Recombinant strain DE3 in presence of 3-O-C12-HSL; Lane 4: Recombinant strain DE3 in the presence of 3-O-C6-HSL. Lane 5: Pathogen *P. carotovorum* grown alone; Lane 6: negative control using the reporter strain alone without culture or extract added to the loading area.



**Figure 5.** Graphic obtained of the ANOVA (95%) analysis performed from the data obtained on the activity essays. The contrast between ( $a-b=-0.666667$ ) and ( $c-d=-123.939$ ) there are not shown significant difference. However, between ( $a-c=-10.397$ ) ( $a-d=-116.364$ ) ( $b-c=-97.303$ ) and ( $b-d=-109.697$ ) there are shown a significant difference. All data analysis shown  $\pm$  Limits=2,278940. The lowest pigmentation means highest activity. To C6-HSL and C8-HSL was obtained the greatest activity. To 3-O-C6-HSL and 3-O-C12-HSL was observed larger pigmentation in the biosensor NTL4, the activity among these AHLs was not significant.

$^{104}\text{HLHFDH}^{109} \approx \text{H}^{169}$ , that correspond to the motif  $^{104}\text{HXH}^{109} \approx \text{H}^{169}$  which is a completely conserved region among AiiA proteins. This motif contains a dinuclear  $\text{Zn}^{2+}$  center in which the Zn1 is coordinated by  $\text{H}^{104}$ ,  $\text{H}^{106}$  and  $\text{H}^{169}$  while the Zn2 is coordinated by  $\text{H}^{109}$ ,  $\text{H}^{235}$ ,  $\text{D}^{108}$  and  $\text{D}^{191}$  (Kim et al., 2005). According to this data, the AiiA from *B. thuringiensis*  $_{147-11516}$  seems to be metallo hydrolytic enzyme. The differences observed between AiiA from *B. thuringiensis*  $_{147-11516}$  (Pedroza et al., 2014) and AHL-lactonase $_{\text{BTK-AiiA}}$  (Kim et al., 2005) in 23 amino acids in which Ile-73 and Met-138 are part of hydrophobic channel and Tyr-165 and Ser-170 differ from the conserved region  $^{165}\text{HTPGHTPGH}^{173}$  involved in Zn coordination, could explain the capability of AiiA $_{147-11516}$  to retain the activity in presence of high concentrations of EDTA and increase three and four times its activity to C4-HSL and C8-HSL respectively (Pedroza et al., 2014).

The lactonase activity of the recombinant strain DE3 harboring the construct pCOLDIV:*aaiA* was evaluated in the presence of synthetic lactones with different acyl side chain lengths, C6-HSL, C8-HSL, 3-O-C6-HSL and 3-O-C12-HSL in the presence of the reporter strains *C. violaceum* CV026 and *A. tumefaciens* NTL4. Based on the observation that the lactones are diffusible on solid media, and that the lactonase activity is inversely proportional to the color intensity, a light blue pigment of the biosensor was observed to 3-O-C6-HSL and

3-O-C12-HSL when they were tested with the biosensor strain NTL4. These data indicates that lactonase inactivation was not complete and that there was remaining lactones in the media (data not shown). It was also observed the ability of recombinant *E. coli* DE3 strain to disrupt *P. carotovorum* communication when they were co-inoculated in the presence of the reporter strain. This attenuation suggests that the lactonase produced by the recombinant strain exhibit activity to modified lactones and interferes to signaling molecules used by *P. carotovorum*.

The high homology and the presence of one conserved motif  $^{104}\text{HXH}^{109} \approx \text{H}^{169}$  indicate that the AHL-lactonase $_{147-11516}$  belongs to the AHL-lactonase family. The ability of the recombinant strain in *P. carotovorum* suggest an important role of AHL-lactonase to interfere the AHLs signaling or AHLs response. Recently, we report the enzymatic hydrolysis from recombinant AiiA $_{147-11516}$  lactonase in order to determine its application (Pedroza et al., 2014). The activity to broad catalytic spectrum of lactones including as *N*-butyryl-L-Homoserine lactone (C4-HSL), *N*-heptanoyl-L-Homoserine lactone (C7-HSL) and the enzymatic hydrolysis to C6-HSL in alkaline pH, activity in high temperature (60°C) and decreasing of enzymatic activity by two metal ions, suggest that this enzyme is a promissory candidate for the disease control programs by plants transformation. Other scenarios such as the addition of enrichment cultures of AHL degrading bacteria *Bacillus* sp. that increase the survival of aquaculture species (Tinh et al., 2008), the control over QS based bacterial biofilms in biorefineries (Hong et al., 2012) and the incorporation of QS inhibitors in medical and dental implants and catheters (Choudhary and Schmit-Dannert, 2010), provide further applications.

## Aknowledgments

The authors thank Dr. Clay Fuqua (Indiana University, Bloomington, Indiana) for providing *C.violaceum* CVO26 and *A. tumefaciens* NTL4. We thank Dr. Oscar Alzate, for his critical review of the manuscript. This work was supported by grants from The Colombian Department of Science, Technology and Innovation (2213-12-13773 and 1299-12-17827) to AMF.

## Bibliography

- Agrios, G. C., 2005. Plant Pathology, Fifth ed. Academic Press, (Ed.), New York. Pp 952.
- Armengol G., Escobar M.C., Maldonado M.E., Orduz S. 2007. Diversity of Colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against dipteran and lepidopteran insects. *Journal of applied microbiology*. 102(1): 77-88.
- Atkinson S., Williams P. 2009. Quorum sensing and social networking in the microbial world. *Journal of The Royal Society Interface*. 6(40): 959-678.
- Bailey T.L., Gribskov M. 1998. Methods and statistics for combining motif match scores. *Journal of Computational Biology*. 5(2): 211-221.



- Barnard A.M., Bowden S.D., Burr T.S., Coulthurst J., Monson R.E., Salmond G.P. 2007. Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 362(1483): 1165-1183.
- Campanella J.J., Bitincka L., Smalley J. 2003. MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics*. 4(1): 29.
- Carlier A., Uroz S., Smadja B., Fray R., Latour X., Dessaux Y., Faure D. 2003. The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an attM-paralogous gene, *aiiB*, also encoding N-Acyl homoserine lactonase activity. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(8): 4989-4993.
- Cerón J., Ortiz A., Quintero R., Guereca L., Bravo A. 1995. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(11): 3826-3831.
- Cha C., Gao P., Chen Y.C., Shaw P.D., Farrand S.K. 1998. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram negative plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 11(11): 1119-1129.
- Charkowski A.O. 2009. Decaying signals: will understanding bacterial-plant communications lead to control of soft rot? *Current opinion in Biotechnology*. 20(2): 178-184.
- Chatterjee A., Cui Y., Hasegawa H., Leigh N., Dixit V., Chatterjee A.K. 2005. Comparative analysis of two classes of quorum-sensing signaling systems that control production of extracellular proteins and secondary metabolites in *Erwinia carotovora* subspecies. *Journal of Bacteriology*. 187(23): 8026-8038.
- Choudhary S., Schmidt-Dannert C. 2010. Applications of quorum sensing in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86(5): 1267-1279.
- Chu W., Vatter D.A., Maitin V., Barnes M.B., McLean R.J.C. 2011. Bioassays of Quorum Sensing Compounds using *Agrobacterium tumefaciens* and *Chromobacterium violaceum*. In: Quorum Sensing: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Rumbaugh, K.P. (Ed). Springer Science-Business Media.
- Dong Y.H., Xu J.L., Li X.Z., Zhang L.H. 2000. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(7): 3526-3531.
- Dong Y.H., Wang L.H., Xu J.L., Zhang H.B., Zhang X.F., Zhang L.H. 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature*. 411(6839): 813-817.
- Dong Y.H., Gusti A.R., Zhang Q.J., Xu L. Zhang L.H. 2002. Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(4): 1754-1759.
- Dong Y.H., Zhang X.F., Xu J.L., Zhang L.H. 2004. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(2): 954-960.
- Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*. 176(2): 269-275.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
- Hong S.H., Hegde M., Kim J., Wang J., Jayaram A., Wood T.K. 2012. Synthetic quorum-sensing circuit to control consortial biofilm formation and dispersal in a microfluidic device. *Nature Communications*. 3: 613. doi:10.1038/ncomms1616
- Jara S., Maduell P., Orduz S. 2006. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains in the maize and bean phylloplane and their respective soils in Colombia. *Journal of applied microbiology*. 101(1): 117-124.
- Jones S., Yu B., Bainton N.J., Birdsall M.B., Bycroft W., Chhabra S.R., Cox A.J.R., Golby P., Reeves P.J., Stephens S., Winson M.K., Salmond G.P.C., Stewart G.S.A.B., Williams P. 1993. The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *The EMBO Journal*. 12(6): 2477-2482.
- Kado C.I., Heskett M.G. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology*. 60: 969-976.
- Kalia C.V. 2013. Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnology Advances*. 31(2): 224-245.
- Kim M.H., Kang H.O., Kang B.S., Kim K.J., Choi W.C., Oh T.K., Lee C.H., Lee J.K. 2005. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of *Bacillus thuringiensis* AHL-lactonase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 1750(1): 5-8.
- Leadbetter J.R., Greenberg E.P. 2000. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *Journal of Bacteriology*. 18: 6921-6926.
- Lee S.J., Park S.Y., Lee J.J., Yum D.Y., Koo B.T., Lee J.K. 2002. Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(8): 3919-3924.
- Lin Y.H., Xu J.L., Hu J., Wang L.H., Ong S.L., Leadbetter J.R., Zhang L.H. 2003. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Molecular Microbiology*. 47(3): 849-860.
- Liu H., Coulthurst S.J., Pritchard L., Hedley P.E., Ravensdale M., Humphris S., Burr T., Takle G., Brurberg M.B., Birch P.R., Salmond G.P., Toth I.K. 2008. Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *PLoS Pathogens*. 4(6): e1000093.
- McClellan K.H., Winson M.K., Fish L., Taylor A., Chhabra S.R., Camara M., Daykin M., Lamb J.H., Swift S., Bycroft B.W., Stewart G.S., Williams P. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*. 143(12): 3703-3711.
- Park S.Y., Lee S.J., Oh T.K., Oh J.W., Koo B., Yum D.Y., Lee J.K. 2003. AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology*. 149(6): 1541-1550.
- Pérombelon M.C., Kelman A. 1980. Ecology of the Soft Rot *Erwinias*. *Annual Review of Phytopathology*. 18(1): 361-387.
- Pedroza C.J., Flórez A.M., Ruiz O.S., Orduz S. 2014. Enzymatic hydrolysis of molecules associated with bacterial quorum sensing using an acyl homoserine lactonase from a novel *Bacillus thuringiensis* strain. *Antonie van Leeuwenhoek*. 105:253-264
- Pirhonen M., Flego D., Heikinheimo R., Palva E.T. 1993. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *The EMBO Journal*. 12(6): 2467-2476.
- Ravn L., Christensen A.B., Molin S., Givskov M., Gram L. 2001. Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by gram negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. *Journal of Microbiological Methods*. 44(3): 239-251.
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4): 406-425.
- Schaad N.W., Jones J.B., Chun W. 2001. Laboratory Guide of Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press (Ed). St. Paul, Minnesota, USA.
- Sio C.F., Otten L.G., Cool R.H., Diggle S.P., Braun P.G., Bos R., Daykin M., Camara M., Williams P., Quax W.J. 2006. Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infection and immunity*. 74(3): 1673-82.
- Smadja B., Latour X., Faure D., Chevalier S., Dessaux Y., Orange N. 2004. Involvement of N-acylhomoserine lactones throughout plant infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium atrosepticum*). *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17(11): 1269-1278.

- Tamura K., Nei M., Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(30): 11030-11035.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28(10): 2731-2739.
- Tempé J., Petit A., Holsters M., Van Montagu M., Schell J. 1977. Thermosensitive step associated with transfer of the Ti plasmid during conjugation: Possible relation to transformation in crown gall. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74(7): 2848-2849.
- Thomas P.W., Stone E.M., Costello A.L., Tierney D.L., Fast W. 2005. The quorum-quenching lactonase from *Bacillus thuringiensis* is a metalloprotein. *Biochemistry*. 44(20): 7559-7569.
- Tinh N.T.N., Yen V.H.N., Dierckens K., Sorgeloos P., Bossier P. 2008. An acyl homoserine lactone-degrading microbial community improves the survival of first-feeding turbot larvae (*Schophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*. 285(1): 56-62.
- Uribe D., Martínez W., Cerón J. 2003. Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 82(2): 119-127.
- Von Bodman S.B., Bauer W.D., Coplin D.L. 2003. Quorum sensing in plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 41(1): 455-482.
- Wang L.H., Weng L.X., Dong Y.H., Zhang L.H. 2004. Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching N-Acyl homoserine lactone lactonase (AHL-lactonase). *Journal of Biological Chemistry*. 279(14): 13645-13651.
- Williams P. 2007. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology*. 153(12): 3923-39238.
- Williams P., Camara M. 2009. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current Opinion in Microbiology*. 12(2): 182-191.
- Winson M.K., Swift S., Fish L.J., Throup P., Jorgensen F., Chhabra S.R., Bycroft B.W., Williams P., Stewart G. 1998. Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiology Letters*. 163(2): 185-192.
- Zhang H.B., Wang L.H., Zhang L.H. 2007. Detection and Analysis of Quorum-Quenching Enzymes against Acyl Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals. *Current Protocols in Microbiology*. 5:1C.3.1-1C.3.15. DOI: 10.1002/9780471729259.mc01c03s05

# Producción de etanol a partir de yuca en condiciones de alta concentración de sólidos (VHG)

## Ethanol production from cassava using very high gravity conditions (VHG)

Mabel Beatriz Esquivia Mercado<sup>\*</sup>, Hader Iván Castaño Peláez<sup>\*\*</sup>, Lucía Atehortúa Garcés<sup>\*\*\*</sup>, Alejandro Acosta Cárdenas<sup>\*\*\*\*</sup>, Carlos Eduardo Mejía Gómez<sup>\*\*\*\*\*</sup>

### Resumen

La investigación realizada evalúa el efecto del medio fermentativo y la concentración de azúcares iniciales sobre la producción de etanol en sistemas batch, cuando se emplean sacarificados de harina de yuca (*Manihot esculenta*), como fuente de carbono. El diseño experimental ejecutado fue de tipo bifactorial de efectos fijos y analiza la productividad de bioetanol en cuatro medios fermentativos diferentes, dos de los cuales se suplementaron con sacarificados de harina de yuca variedad Copiblanca. Las concentraciones de azúcares iniciales evaluadas en estos sustratos fueron de 250, 300 y 350 g/L. Estos tratamientos fermentativos fueron inoculados con una variedad etanológica comercial de *S. cerevisiae* a una concentración de 0.05% (p/v). Las condiciones de proceso incluyeron un volumen final de 150 mL, una incubación a 35°C por 48 horas, agitación constante de 150 rpm y pH entre 4.0 y 4.5. Los sacarificados provenientes de esta variedad de yuca usados como fuente de carbono, mostraron ser excelentes sustratos para la obtención de etanol. Se evidenciaron aumentos de más del 500% en términos de productividad volumétrica con respecto al control experimental y se alcanzaron concentraciones finales de etanol del 14.7%v/v, asociadas a rendimientos producto/sustrato de 0,48 g/g y productividades de 2,4 g/L/h. Estos parámetros cinéticos fueron logrados con el medio fermentativo más simple evaluado, medio compuesto por los sacarificados como fuente de carbono y como única fuente nutricional, bajo concentraciones de azúcares iniciales de 250g/L; lo que demuestra la aptitud de estos sustratos para efectos de producción etanólica.

**Palabras clave:** Bioetanol, sacarificados de harina de yuca, fermentaciones con alto contenido de sólidos.

### Abstract

This research exposes the fermentative medium and initial sugar concentration effect on ethanol production in batch systems, when used glucose syrups derivatives of cassava (*Manihot esculenta*), as a carbon source. The experimental design was factorial and analyzes the productivity of bioethanol in four different fermentation media, two of which were supplemented with cassava flour sugared. The initial sugar concentrations tested on these substrates were 250, 300 and 350 g / L. These fermentative treatments were inoculated with a commercial ethanolic variety of *S. cerevisiae* at a concentration of 0.05% (w / v). The process conditions included a final volume of 150 mL, incubation at 35 ° C for 48 hours , constant stirring at 150 rpm and pH between 4.0 and 4.5. The saccharified from this cassava variety showed be excellent substrate for the bioethanol production, achieving increases of 550% in terms of volumetric productivity over the control experiment, the above, allowed us to achieve final concentrations of ethanol of 14.7% v / v, yields product / substrate of 0.5 g / g, and productivities of 2.4 g / L / h. Most interesting is that these kinetic parameters were achieved with the simplest fermentation medium evaluated, the mean was compound of saccharified as a carbon source and

\* M.Sc. Grupo de Biotransformación. Universidad de Antioquia. Calle 67 No. 53-108/Bloque 5 Laboratorio 226. Medellín, Colombia. mbem19@gmail.com

\*\* M.Sc. Facultad de Administración. Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid. Carrera 48 No. 7-151. Medellín, Colombia. hcastano954@gmail.com

\*\*\* PhD. Grupo de biotecnología Vegetal. Universidad de Antioquia. Calle 70 No. 52 - 21, A.A. 1226. Medellín, Colombia. latehor@gmail.com

\*\*\*\* M.Sc. Grupo de Biotransformación. Universidad de Antioquia. Calle 67 No. 53-108/Bloque 5 Laboratorio 226. Medellín, Colombia. aleacos-ta45@gmail.com

\*\*\*\*\* M.Sc. Grupo de Biotransformación. Universidad de Antioquia. Calle 67 No. 53-108/Bloque 5 Laboratorio 226. Medellín, Colombia. mcmeg@udea.edu.co

as a sole source of nutrition, and its initial concentration of sugars was 250g / L; the above shows the ability of these substrates for ethanol production purposes.

**Keywords:** Bioethanol, cassava flour saccharified, very high-gravity fermentations.

**Recibido:** octubre 5 de 2013

**Aprobado:** abril 25 de 2014

## Introducción

La avanzada crisis ambiental y la futura crisis energética y económica, pueden ser enfrentadas con la producción de biocombustibles, la cual sería exitosa si se establecen tempranamente políticas que regulen su alcance y que protejan aspectos tan importantes como la seguridad alimentaria de las comunidades involucradas en la explotación de los recursos renovables destinados para tal propósito.

Debe tenerse en cuenta que no son solo ambientales los beneficios de los combustibles ecológicos tales como el biodiesel y el bioetanol, ya que alrededor de estas interesantes estrategias de energía alternativa, se tejen importantes unidades de negocios, que promueven el desarrollo rural e impactan positivamente el empleo en el campo; muestra de ello es Brasil, país que se vio obligado con la crisis de los precios del petróleo en la década de los setenta a cambiar las fuentes convencionales de abastecimiento energético, creando toda una industria del etanol que en el año 2000 alcanzó los 700.000 empleos a partir de uso de biomasa procedente de la caña, Menéndez (2001). Experiencias como estas son seguidas por países que le han apostado a la producción de alcohol carburante a partir de biomasa vegetal, tales son los casos de EEUU con los cultivos de maíz, India con la caña de azúcar y Tailandia con biomasa de yuca, Lan *et al.* (2007).

Son diversas las estrategias fermentativas asociadas a la producción de etanol a partir de biomasa vegetal; sin embargo, una de las mejor calificadas por sus interesantes ahorros energéticos e hídricos, eficiente autocontrol microbiano y altas concentraciones finales de etanol, ha sido el modelo fermentativo bajo condiciones de alto contenido de sólidos; modelo caracterizado por fermentaciones a contracciones superiores de 270 g/L Bai *et al.* (2004). La aplicación de este modelo ha ofrecido resultados satisfactorios en materia de producción etanólica, logrando porcentajes finales de etanol y rendimientos producto/sustrato que oscilan entre 12 a 18%v/v y 0.45 a 0.49 g/g respectivamente, a partir de sustratos amiláceos procedentes de trigo son regularmente suplementados con fuentes de nitrógeno y micronutrientes específicos, Jones *et al.* (1994). Las optimizaciones de este tipo de medios de cultivo han sido evaluadas, a fin de disminuir los tiempos de fermentación y los costos de producción por concepto de la suplementación nutricional, punto en el que el sorgo dulce ha ofrecido una interesante alternativa; recientes reportes revelan que solo con la suplementación de la fuente de nitrógeno, este sustra-

to ofrece porcentajes de etanol próximos al 15%v/v y rendimientos producto/sustrato entre 0.49 y 0.5 g/g, bajo cinéticas de fermentación cercanas a las 56 horas, (Nuapeng *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2013). Parte del éxito de estas estrategias fermentativas depende del tipo de cultivo amiláceo empleado y su contenido propio de nutrientes, variable que juega un papel determinante en la viabilidad técnico-económica de los modelos evaluados y que definen su adaptación a las realidades del sector industrial alcoholero.

La industria del etanol en América Latina es promisoría dada la biodiversidad de sus cultivos amiláceos y la riqueza y extensión de sus tierras disponibles para uso agrícola. Colombia es uno de los países de mayor productividad en materias primas de enorme peso en la producción futura de biocombustibles con cultivos que incluyen caña de azúcar, sorgo dulce, remolacha, maíz, cebada y yuca, Bochno (2008). Este último cultivo ha sido propuesto por el Ministerio de Minas y Energía, después de la caña azucarera, para la obtención de bioetanol de primera generación; decisión que no es gratuita, ya que tiene la capacidad de tolerar la sequía y los suelos degradados, con lo que ha asegurado su importancia económica a nivel mundial. La yuca se adapta a diferentes condiciones agro ecológicas, climáticas y su cultivo requiere de poca tecnología, además presenta bajo costo de producción, poca mano de obra requerida, alta estabilidad de sus rendimientos y un largo período de cosecha. Soportado en estas ventajas agroindustriales, el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural en 2001 inicia el proyecto “Alianzas Productivas para la Paz”, bajo el cual se estudiaron 40 variedades yuca, de estas se seleccionaron 12 exponentes a abril de 2003 y son las que actualmente se tienen sembradas en más de 110 hectáreas en Mutatá – Urabá Antioqueño. Entre las variedades seleccionadas como clones de altos rendimientos se cuentan Copiblanca, Copiroja, la Verónica y Ginnés con las que se puede lograr hasta 25 t/ha, MADR (2001).

En resonancia a este llamado socio-económico y medioambiental, y con el fin de contribuir al fortalecimiento de la cadena productiva de la yuca, se desarrolla el presente estudio aplicado cuyo propósito es evaluar la aptitud de los sacarificados de harina de yuca variedad Copiblanca (clon seleccionado como de alto rendimiento de acuerdo a los últimos estudios del CIAT en el Urabá Antioqueño), para efectos de su bio-conversión a etanol con una cepa comercial de demostrada capacidad etanológica, cuando se emplean condiciones de alto contenido de sólidos.



## **Materiales y métodos**

### ***Microorganismos y condiciones de cultivo***

Los microorganismos empleados fueron dos variedades nativas de *S. cerevisiae* obtenidas por estudios de bioprospección microbiana para estos propósitos y facilitadas por el Laboratorio de Biotransformación de la Universidad de Antioquia, y una variedad etanológica comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (cuya referencia no es reportada en este trabajo). Las condiciones de manejo incluyeron su mantenimiento bajo temperaturas de refrigeración en placas de agar PDA (Papa Dextrosa Agar) y su respectiva reactivación en caldos YM (Yeast Medium), para su posterior inoculación en los medios alternativos evaluados.

### ***Selección de la cepa etanológica***

La selección de la cepa de *S. cerevisiae* incluyó criterios de etanol-tolerancia y producción etanólica en medio estándar modificado YM (Yeast Medium). Se manejó la misma composición nutricional del medio base, sólo que la fuente de carbono fue reemplazada en origen y concentración por sacarificados de harina de yuca variedad Copiblanca a 100g/L en términos de azúcares fermentables, respectivamente, a fin de generar un reto osmolar primario con la fuente de carbono de interés para el presente estudio. Las condiciones de cultivo incluyeron el uso de Erlenmeyers de 250 mL, en donde los volúmenes finales fueron de 150 mL mantenidos en condiciones de anaerobiosis, se manejó una agitación de 150 rpm y una temperatura de 35 °C. El pH del proceso fermentativo osciló entre 4.0 y 4.5 y el inóculo de levadura utilizado fue del 0.05% (p/v). El tiempo de cultivo evaluado fue de 24 horas con muestreo único a final de proceso.

### ***Preparación de hidrolizados de harina de yuca variedad Copiblanca***

Se realizaron suspensiones de harina de yuca variedad Copiblanca al 40% p/v, a las cuales se les ajustó el pH a 5.5 previa adición de  $\text{Ca}^{2+}$  a 30 ppm. Las suspensiones fueron licuadas durante 2.5 horas a una temperatura de 83°C, empleando para tal fin una amilasa comercial Termamyl® 120 L a una dilución de 0.5 mL/L. Posteriormente el material licuado fue llevado a un pH de 4.5 por adición de NaOH y sometido a sacarificación durante 6 horas a 60 °C, la enzima utilizada en este proceso fue una amiloglucosidasa comercial AMG® 300L a una concentración de 1.5 mL/L. Ambas enzimas con actividades de 120 KNU/g y 300 AGU/ml respectivamente, son ofrecidas por Novozymes a través de Coldanzimas Ltda. en Colombia. Los sacarificados obtenidos fueron objeto de análisis bromatológico.

### ***Medios de fermentación***

Se evaluaron dos medios de fermentación, cada uno de los cuales contó con su respectivo control; los me-

dios estudiados fueron: *Sacarificado de harina de yuca variedad Copiblanca (MS)*, el cual fue obtenido por la licuefacción y posterior sacarificación de la harina de yuca, siendo el sacarificado obtenido el único nutriente empleado en este medio. *Medio Formulado (MF)*, cuya composición fue obtenida por balance estequiométrico empleando para ello la constitución bioquímica de la levadura. En este balance se consideró el nitrógeno, potasio y magnesio propio de las materias primas empleadas. La fuente de carbono fue suplementada a partir de los sacarificados de harina de yuca; las fuentes de nitrógeno y micronutrientes fueron suplementadas por sales de uso convencional en la industria alcohólica (ver tabla 1).

Los controles manejados hacen referencia al *Control del Sacarificado (CS)*, que emplea como fuente de carbono y único constituyente glucosa anhidra y al *Control del Medio Formulado (CF)*, este presentó la misma composición que el medio obtenido por formulación (MF), sin embargo la fuente de carbono fue suplementada por glucosa anhidra.

Los niveles de concentración de azúcares iniciales (CAI) objeto de evaluación fueron: 350, 300 y 250 g/L en términos de glucosa, tanto para los medios suplementados con sacarificado como para aquellos que se trabajaron con glucosa anhidra.

### ***Condiciones de fermentación***

Las fermentaciones fueron llevadas a cabo en sistemas discontinuos para lo cual se hizo uso de Erlenmeyers de 250 mL, en donde los volúmenes de fermentación fueron de 150 mL mantenidos en condiciones de anaerobiosis, se manejó una agitación de 150 rpm y una temperatura de 35°C. El pH del proceso fermentativo osciló entre 4.0 y 4.5 y el inóculo de levadura utilizado fue del 0.05% (p/v). Las cinéticas de fermentación se evaluaron durante 48 horas con muestreos cada 8 horas.

### ***Muestreo y análisis de muestras***

Los muestreos se realizaron por extracción de 5mL del fermentado manteniendo las condiciones de anaerobiosis; del volumen extraído 1mL fue usado para cuantificación de biomasa por peso seco, el material restante fue sometido a centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante obtenido fue empleado para determinación de azúcares reductores por DNS y para análisis de glucosa por GOD-PAD; la cuantificación de etanol, fue realizada por HPLC empleando un cromatógrafo Agilent 1200 y una columna BioRad Aminex HPX-87H (300x 7.8 mm), la fase móvil manejada fue una solución de 0.012 N de ácido sulfúrico con un flujo de 0.5 mL/min y una temperatura de 65°C, para las lecturas fue utilizado un detector de índice de refracción. Los estudios de viabilidad se apoyaron en la técnica de azul de tripán. Las células

**Tabla 1.** Composición de los Medios Fermentativos.

Compuesto Nutricional	Composición del Medio Fermentativo en g/L			
	MS	MF	CS	CF
Azúcares fermentables vía Sacarificados de Harina de Yuca	250-300-350*	250-300-350*		
Glucosa			250-300-350**	250-300-350**
Fosfato de Amonio		13		13
Fosfato de Potasio		7		7
Sulfato de Magnesio		4		4

La composición de los medios fermentativos se definió por el origen de los azúcares fermentables y la presencia ó ausencia de suplementación con sales fermentativas.

\* Concentración de azúcares iniciales obtenida a partir de sacarificados de harina de yuca var. Copiblanca;

\*\* Concentración de azúcares iniciales obtenida a partir de glucosa.

con capacidad proliferativa se cuantificaron por siembra en PCA con el consecuente cálculo de UFC/mL.

Los sacarificados fueron sometidos a análisis de proteínas por el método 968.05 de la AOAC, la determinación de cenizas solubles fue realizada por el método 923.03 de la AOAC, la cuantificación de la fibra soluble se realizó por el método 31.012 de la AOAC. La determinación de oligosacáridos desde DP2 a DP10 (cadenas de glucosa de 2 unidades hasta 10 unidades), fue realizada por HPLC con una columna Bio-Rad Aminex HPX-87P (300x 7.8 mm), la fase móvil fue agua MilliQ desgasificada con un flujo de 0.5 mL/min y una temperatura de 85°C, las lecturas se hicieron en un detector de índice de refracción.

En las harinas, la determinación de almidón post-hidrólisis ácida se realizó por el método 906.03 de la AOAC. Los análisis de grasa y humedad se realizaron por los métodos 925.45 y 920.39 referidos en la AOAC, respectivamente.

### Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental utilizado es de tipo bifactorial de efectos fijos, cuyos factores fueron la concentración de azúcares inicial (CAI) y el tipo de medio de fermentación, los cuales fueron evaluados a 3 y 4 niveles respectivamente.

Las variables de respuesta analizadas fueron rendimiento etanólico y productividad volumétrica de etanol, vía Análisis de Varianza, para lo que se empleó el paquete estadístico Statgraphics plus v 5.1.

## Resultados y discusión

### Cepa etanológica seleccionada

La viabilidad post-fermentación fue considerada como el indicador de tolerancia al etanol, el cual es bioquímicamente mas tóxico que el adicionado al medio de

cultivo, esto debido al paso trans-membranal obligatorio, propio de los procesos de excreción de este producto metabólico, Bai et al. (2008).

La producción etanólica fue medida en términos del rendimiento Yp/s (g etanol/g glucosa), obtenido en fermentaciones de 24 horas bajo concentraciones de azúcares iniciales de 100g/L.

Los resultados mostraron que la cepa de mejor desempeño etanólico y mayor etanol-tolerancia fue la variedad comercial de *Saccharomyces cerevisiae*, con valores de rendimiento y viabilidad post-fermentación de 0.5g/g y 88% respectivamente. Los datos de esta evaluación comparativa se muestran en la tabla 2.

### Sacarificado de harina de yuca variedad Copiblanca obtenido

La harina de yuca variedad Copiblanca llevada hasta procesos de sacarificación, permitió la obtención de jarabes de glucosa cuya composición se muestra en la tabla 3. El sustrato bio-convertible a etanol presente en las harinas de yuca var. Copiblanca, corresponde a su fracción de almidón, la cual fue valorada en un 78.7% p/p base seca. El contenido de humedad fue del 13.6%, proteína del 4.4%, fibra 4.1%, cenizas del 1,9% e insolubles del 6.8 %, base húmeda. No se encontraron azúcares libres en la harina de yuca empleada.

La conversión enzimática de la fracción de almidones presentes en la harina de yuca a azúcares fermentables por la levadura, corresponde al 97%; el 3% restante se halló en forma de azúcares reductores con cadenas iguales o superiores a 4 unidades de glucosa (Dp4 a Dp10).

Los sacarificados procedentes de la harina de yuca variedad Copiblanca sometida a procesos de hidrólisis enzimática, presentaron en materia de azúcares fermentables, solo monómeros (glucosas), ya que hubo ausencia de maltosas y maltotriosas, siendo el siguiente oligosacárido de menor tamaño presente en

los sacarificados obtenidos, las maltotetrosas cuya estructura no es compatible para su bioasimilación por *S. cerevisiae*, Zhu et al. (2005), por esta razón la base de cálculo para los rendimientos producto/sustrato se redujo solo a la glucosa como único azúcar presente en nuestros sacarificados teóricamente fermentable por la levadura.

Por cada unidad de glucosa, se obtienen 2 unidades de etanol, por lo que se afirma que teóricamente por cada 180 gramos de glucosa se generan 92 gramos de etanol, resumiéndose lo anterior en un rendimiento esperado del 0.51 g/g como consecuencia de la estequiometría propia de esta biorreacción. Por lo que los hallazgos anteriores permiten afirmar que por cada gramo de harina de yuca variedad Copiblanca, se obtienen 0.43 gramos de etanol.

**Tabla 2.** Evaluación de la Etanol-Tolerancia de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en Medio YM modificado.

Cepa de <i>S. cerevisiae</i>	Viabilidad Post-Fermentación (%)	Y p/s (g/g)
<i>S. cerevisiae</i> (cepa nativa 1)	72.02	0.43
<i>S. cerevisiae</i> (cepa nativa 2)	67.33	0.39
<i>S. cerevisiae</i> var. comercial	88.25	0.50

Este medio estándar es conocido como YM, medio universal para levaduras y que se comporta como medio base en esta evaluación comparativa, cabe aclarar que se suplementó con sacarificados de harina de yuca hasta alcanzar 100g/L en azúcares reductores.

**Tabla 3.** Composición del sacarificado de harina de yuca variedad Copiblanca

Componente	Porcentaje
Glucosa	84.1
Oligosacaridos (Dp4-Dp10)	2.9
Proteína	4.3
Fibra soluble	2.5
Cenizas solubles	1.2
Insolubles totales	5.0

Composición en porcentaje de base seca de sacarificado.

### Efectos del medio de cultivo y la concentración de azúcares iniciales sobre la producción de etanol

La generación de etanol a partir de sacarificados de harina de yuca presenta resultados asociados a amplios rangos de producción, en donde se hacen claros los efectos de la concentración de azúcares iniciales, así como el tipo de medio de fermentación empleado (ver figura 1).

Particularmente, el uso de los sacarificados de harina de yuca como fuente de carbono y única fuente nutricional (MS), muestra un impacto positivo en la producción de etanol, debido a que no presenta efectos inhibitorios sobre la viabilidad celular, (aspecto de vital importancia en la industria de etanol, que regularmente emplea el reuso de la biomasa de levadura para efectos de nuevas fermentaciones) y en la productividad etanólica.

Un indicador indirecto de la inhibición metabólica de la levadura, es el grado de asimilación de la fuente de carbono y su consecuente desviación hacia etanol y/o biomasa, parámetro medido en términos de glucosa residual; para el caso, a mayor glucosa residual, menor grado de asimilación, lo que revelaría una mayor inhibición microbiana. Este parámetro se muestra altamente sensible dependiendo del tipo de medio fermentativo empleado y la concentración de azúcares iniciales evaluada (ver tablas 4, 5, 6 y 7).

La figura 2 permite identificar el medio sacarificado con una CAI de 250 g/L (MS 250), como el medio más favorable para la producción de etanol y expone una comparación de los rendimientos para cada medio de fermentación empleado. La producción etanólica medida en términos de concentración final de producto resulta ser interesante cuando se trabaja como medio de fermentación el sacarificado de harina de yuca sin suplementar (MS), alcanzando porcentajes del 14.7% v/v. Este valor se encuentra en el límite superior de lo convencionalmente esperado, dado que las producciones etanólicas en sistemas batch oscilan entre 3.2 a 12.7%v/v, Sánchez et al. (2005).

**Tabla 4.** Producción de etanol en medio sacarificado.

Parámetro	Medio Sacarificado		
CAI (Inicial de Azúcares)	250	300	350
P (%v/v)	14,70	12,62	11,81
S (g/L)	7,04	26,40	43,10
Yp/s (g/g)	0,48	0,36	0,30
Qs (g/Lh)	5,06	5,70	6,39
E (%)	93,42	71,22	59,42

P, Concentración final de Etanol en % v/v; S, Glucosa residual en g/L; Yp/s, Rendimiento producto/sustrato en g/g; Qs, Consumo volumétrico de sustrato en g/Lh; E, Porcentaje de Rendimiento con respecto al teórico en %. Las concentraciones de glucosa iniciales fueron de 250,300 y 350 g/L. Los parámetros fermentativos son calculados con un tiempo de 48h.

Productividades de 2.42 g/Lh, asociadas a concentraciones de etanol de 14.7%v/v, son experimentadas con los sacarificados de harina de yuca variedad Copiblanca sin ningún tipo de adición de sales o enzimas reductoras de viscosidad. La composición química del sustrato es suficiente para soportar la producción de

**Tabla 5.** Producción de etanol en medio formulado.

Parámetro	Medio Formulado		
CAI (Inicial de Azúcares)	250	300	350
P (%v/v)	3,10	0,82	1,04
S (g/L)	76,02	94,68	90,63
Yp/s (g/g)	0,14	0,03	0,03
Qs (g/Lh)	3,62	4,28	5,40
E (%)	27,51	6,17	6,19

P, Concentración final de Etanol en % v/v; S, Glucosa residual en g/L; Yp/s, Rendimiento producto/sustrato en g/g; Qs, Consumo volumétrico de sustrato en g/Lh; E, Porcentaje de Rendimiento con respecto al teórico en %. Las concentraciones de glucosa iniciales fueron de 250,300 y 350 g/L. Los parámetros fermentativos son calculados con un tiempo de 48h.

**Tabla 6.** Producción de etanol en control medio sacarificado.

Parámetro	Control Sacarificado		
CAI (Inicial de Azúcares)	250	300	350
P (%v/v)	2,34	2,72	2,31
S (g/L)	85,76	83,25	88,94
Yp/s (g/g)	0,11	0,10	0,07
Qs (g/Lh)	3,42	4,52	5,44
E (%)	22,00	19,38	13,66

P, Concentración final de Etanol en % v/v; S, Glucosa residual en g/L; Yp/s, Rendimiento producto/sustrato en g/g; Qs, Consumo volumétrico de sustrato en g/Lh; E, Porcentaje de Rendimiento con respecto al teórico en %. Las concentraciones de glucosa iniciales fueron de 250,300 y 350 g/L. Los parámetros fermentativos son calculados con un tiempo de 48h.

**Tabla 7.** Producción de etanol en control medio formulado.

Parámetro	Control Formulado		
CAI (Inicial de Azúcares)	250	300	350
P (%v/v)	1,03	1,34	0,83
S (g/L)	91,14	90,1	92,02
Yp/s (g/g)	0,05	0,05	0,03
Qs (g/Lh)	3,31	4,37	5,37
E (%)	10,01	9,86	4,97

P, Concentración final de Etanol en % v/v; S, Glucosa residual en g/L; Yp/s, Rendimiento producto/sustrato en g/g; Qs, Consumo volumétrico de sustrato en g/Lh; E, Porcentaje de Rendimiento con respecto al teórico en %. Las concentraciones de glucosa iniciales fueron de 250,300 y 350 g/L. Los parámetros fermentativos son calculados con un tiempo de 48h.

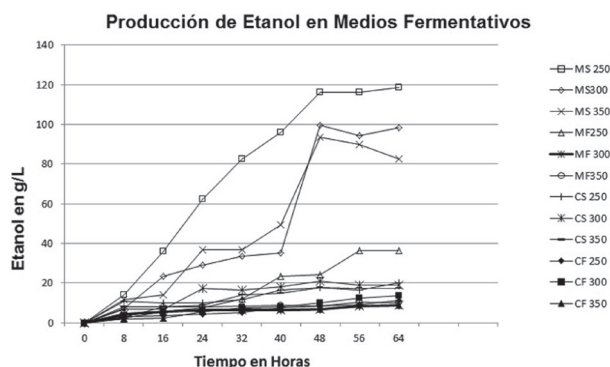
etanol, ya que estos resultados se obtuvieron en el medio sacarificado. Lo anterior, puede deberse a que estos sacarificados presentan otros componentes que incluyen derivados proteicos, cenizas y sales, los cuales contribuyen al adecuado desarrollo de la levadura en estado de anaerobiosis, facilitando el curso de la vía metabólica fermentativa (ver tabla 3). El uso de otro tipo de harinas, más que del componente amiláceo de manera independiente, ha mostrado resultados interesantes. Procesos de sacarificación fermentación simultánea (SSF) de masas de papa con 304 g/l de carbohidratos disueltos, uso de enzimas reductoras de viscosidad y suplementación del medio con sales, alcanzaron concentraciones de etanol de 16.61 %v/v y rendimientos de 89.7%, Srichuwong *et al.* (2009).

Por otro lado, Lim *et al.*, en 2013 alcanzaron concentraciones de etanol de 14.92% v/v, fermentando masas de papa en condiciones de alta concentración de sólidos (28% p/v). En este estudio se usaron también enzimas reductoras de viscosidad y se suplementó el medio con sulfato de amonio. Los resultados fueron similares a los encontrados en este proyecto. Resultados obtenidos con otros sustratos como la patata en condiciones de alta concentración de sólidos, también son correspondientes a nuestros hallazgos; Cao *et al.*, en 2011 manejaron condiciones de proceso SSF con concentraciones de carbohidratos de 284 g/l, alcanzando concentraciones de 15.5% v/v y rendimientos de etanol del 87.8%. Mejores resultados fueron los obtenidos por Zhang *et al.*, en 2010, utilizando xilanasa para reducir la viscosidad del medio; en este caso la concentración final de etanol obtenida fue del 17% v/v, a partir de medios con 300 g/l de carbohidratos.

Otras experiencias con harina de yuca incluyen las reportadas por Yingling, *et al.*, en 2011, que alcanzaron concentraciones de 18.46% p/p (22 %v/v), fermentando masas de yuca en condiciones SSF, concentraciones muy superiores a las alcanzadas en este proyecto; mostrando las ventajas de los estudios de optimización multiobjetivo en los procesos fermentativos. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de incorporar técnicas de optimización a nuestros resultados y mejorar los rendimientos y concentraciones finales de etanol, además de explorar la posibilidad de evaluar la estrategia de proceso de sacarificación y fermentación simultánea.

Sin embargo, se observa que los sacarificados de harina de yuca var. Copiblanca suplementados con sales de acuerdo a formulación estequiométrica (MF) no favorecen la producción etanólica, aunque debe tenerse en cuenta que las concentraciones de azúcares y sólidos disueltos manejadas en la experimentación fueron altas, lo que se traduce en fuertes osmolaridades dentro de los medios fermentativos, las cuales aumentan cuando la fuente de carbono es suplementada con sales de convencional uso en fermentación (adición de sales a los sacarificados de harina de yuca). Este aumento de osmolaridad puede superar la tolerancia





**Figura 1.** Comparación de la producción de etanol en el tiempo en Medios de Fermentación. MS, Medio Sacarificado; MF, Medio Formulado; CS, Control Sacarificado; CF, Control Formulado. Las concentraciones de azúcares iniciales fueron de 250,300 y 350 g/L. Los análisis de etanol fueron realizados por triplicado con coeficientes de variación menores al 3%.

de la levadura frente a esta variable, lo que explicaría el comportamiento de los resultados obtenidos. Lo anterior indica que los modelos de suplementación deberían manejar fuentes complementarias de alto valor nutricional específico en materia de nitrógeno y micronutrientes y que a su vez aporten la menor osmolaridad posible; tal es el caso de la suplementación con matrices biológicas tipo extracto de levadura en bajos niveles y que ofrecen un ajuste nutricional adecuado para efectos de la producción de bioetanol y el incremento de sus parámetros cinéticos, Nuapeng *et al.* (2010); sin embargo, este tipo de fuentes suplementarias están asociadas a altos costos, punto que debe ser analizado para valorar la viabilidad técnica de su aplicación a escala industrial.

Con un p-valor de 0.000, el medio fermentativo confirma un efecto estadísticamente significativo sobre la productividad de etanol, la anterior afirmación e emite con un 95,0% de confianza. Esto es totalmente coherente con lo observado en la figura 2, en donde es claro el positivo impacto de los sacarificados de harina de yuca sin suplementar (MS), sobre los parámetros cinéticos de la fermentación etanólica (ver figura 3).

Por otro lado la concentración de azúcares iniciales (CAI), evidencia el favorecimiento práctico de la producción etanólica conforme baja su nivel; este comportamiento puede explicarse dado que al disminuir la concentración de azúcares iniciales disminuye el efecto inhibitorio por sustrato generado por los azúcares presentes en los hidrolizados de harina de yuca. Lo anterior confirma que las mejores condiciones para la producción de etanol incluyen el medio sacarificado sin suplementar (MS), cuando se trabaja con concentraciones iniciales de azúcares de 250g/L (ver figura 4).

## Conclusiones

Los sacarificados de harina de yuca como fuente única nutricional mostraron ser un interesante sustrato, ya que la producción de etanol bajo su uso fue aún mayor que cuando se empleó suplementación con sales fermentativas y glucosa anhidra, esta última es de fácil consumo por la levadura al tratarse de un monómero y es considerada como la fuente de carbono estándar para este tipo de biorreacciones, Monsalve *et al.* (2006); lográndose aumentos de más del 500% en términos de productividad volumétrica con respecto a este control.

El uso de los hidrolizados de harina de yuca sin suplementar (MS), como medio alternativo para la fermentación etanólica demostró favorecer en alto grado los rendimientos y productividades de etanol, los cuales oscilaron entre 0.48–0.30 g/g y 2.4–1.9 g/Lh, respectivamente, llevando estos parámetros a los límites superiores de lo reportado por la literatura para procesos batch. Estos niveles se obtienen en sustratos amiláceos sin suplementar, es decir, con el medio más simple de los evaluados en este trabajo experimental (MS).

Los hallazgos del estudio realizado evidencian la aptitud de los sacarificados de harinas de yuca como medios fermentativos interesantes para la producción de bioetanol a través de variedades comerciales de *S. cerevisiae*.

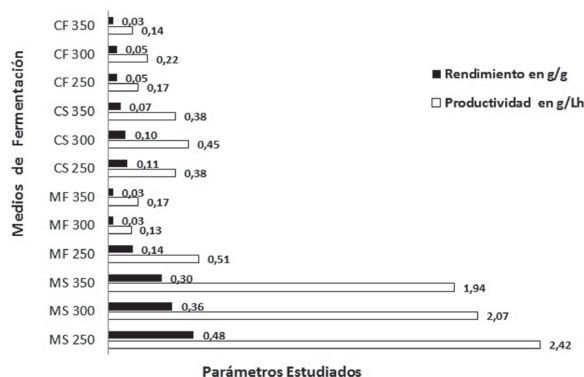
## Agradecimientos

El presente trabajo fue posible gracias a la colaboración técnica del Grupo de Biotransformación de la Universidad de Antioquia y el Grupo de Biotecnología de la Universidad de Antioquia. Los autores también expresan su agradecimiento a FUNDAUNIBAN, la Secretaría de Agricultura de Antioquia y el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) por la financiación del proyecto.

## Referencias bibliográficas

- Bai F., Anderson W., Young M. 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*. 26: 89–105.
- Bai F., Chen L., Zhang Z., Anderson W., Young M. 2004. Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. *Journal of Biotechnology* 110 (3): 287–293.
- Bochno H. 2008. Investigación en Materias Primas para Biocombustibles. Taller II Plan BLOCOM.
- Cao Y., Tian H., Yao K., Xuan Y. 2011. Simultaneous saccharification and fermentation of sweet potato powder for the production of ethanol under conditions of very high gravity. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*. 5 (3): 318–324.
- Chan P., Laopaiboon L., Jaisil P., Laopaiboon P. 2013. High Level Ethanol Production by Nitrogen and Osmoprotectant Supplementation under Very High Gravity Fermentation Conditions. *Electronic Journal of Energy*. 6: 884–899.
- Jones A., Ingledew W. 1994. Fuel Alcohol Production: Optimization of Temperature for Efficient Very-High-Gravity Fermentation.

## Productividad y Rendimientos de la Producción de Etanol a partir de Harina de Yuca



**Figura 2.** Comparación de productividades y rendimientos (Yp/s) en Medios de Fermentación. MS, Medio Sacarificado; MF, Medio Formulado; CS, Control Sacarificado; CF, Control Formulado. Las concentraciones de azúcares iniciales fueron de 250,300 y 350 g/L.

Análisis de la Varianza para Productividades de Etanol					
Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	SC	GL	Cuadrado Medio	Coefficiente F	P-Valor
Medio Fermentativo	7,92039	3	2,644013	139,65	0,0000
Concentración de Azúcares Iniciales (CAI)	0,0922294	2	0,046147	2,44	0,1676
RESIDUOS	0,113429	6	0,0189048		
TOTAL (CORREGIDO)	8,12611	11			

**Figura 3.** ANOVA del diseño experimental. Análisis de los efectos principales del medio de cultivo y la concentración de azúcares iniciales (CAI).

mentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 60 (3):1048-1051.

Lan T., Nguyen T., Gheewala S., and Garivait, S. 2007. Full Chain Energy Analysis of Fuel Ethanol from Cassava in Thailand. *Environmental Science & Technology*. 41 (11): 4135-4142.

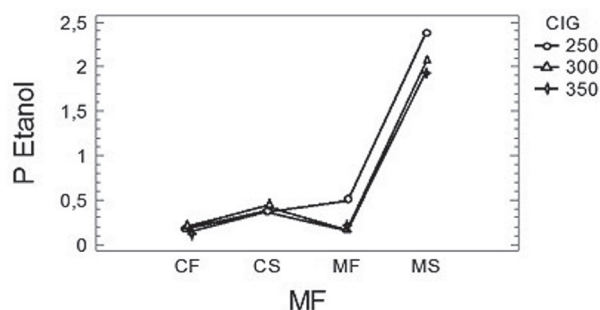
Lim Y., Jang J., Kim K. 2013. Production of high concentration of ethanol from potato tuber by high gravity fermentation. *Food Science and Biotechnology*. 22 (2): 441-448.

Loapaiboon L., Sunan N., Penjit S., Preekamol K., Pattana L. 2009. Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations. *Bioresource Technology*. 100: 4176-4182.

MADR. 2001. Proyecto Alianzas Productivas para la Paz. Documento Conpes 3111. República de Colombia, Departamento Nacional de Planeación.

Menéndez E. 2001. "Energías renovables, sustentabilidad y creación de empleo. Una economía impulsada por el sol". Madrid. Ed. Menéndez Pérez, E.; Los libros de la catarata y Fundación 1º de Mayo, p 31.

## Gráfico de Interacción



**Figura 4.** Interacción entre los Factores referentes a Medio de Fermentación y Concentración Inicial de Glucosa sobre la Productividad Etanólica. Se muestra la productividad de etanol en g/L/h (P Etanol) y su relación tanto con el medio de fermentación (MF), manejado bajo cuatro alternativas CF: control del medio formulado; CS: control del sacarificado; MF: medio formulado; MS: medio sacarificado; como con la concentración inicial de glucosa (CIG), manejada a 250, 300 y 350 g/L.

Monsalve J., Medina V., Ruiz A. 2006. Producción de Etanol a partir de Cascara de Banano y de Almidón de Yuca. *DYNA*. 73 (150): 21-27.

Nuanpeng S., Laopaiboon L., Srinophakun P., Klanrit P., Jaisil P., Laopaiboon P. 2011. Ethanol production from sweet sorghum juice under very high gravity conditions: Batch, repeated-batch and scale up fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*. 14 (1): 1-12.

Sánchez O., Cardon, J. 2005. Producción Biotecnológica de Alcohol Carburante II: Integración de Procesos. *Revista Virtual Interciencia*. 30(11) 679-686.

Srichuwong S., Fujiwara M., Wang X., Seyama T., Shiroma R., Arakane M., Mukojima N., Tokuyasu K. 2009. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol. *Biomass and Bioenergy*. 33 (5): 890-898.

Yingling B., Li C., Honglin W., Xiwen Y., Zongcheng Y. 2011. Multi-objective optimization of bioethanol production during cold enzyme starch hydrolysis in very high gravity cassava mash. *Bioresources Technology*. 102(17): 8077-8074.

Zhang L., Chen Q., Jin Y., Xue H., Guan J. 2010. Energy-saving direct ethanol production from viscosity reduction mash sweet potato at very high gravity (VHG). *Fuel Processing Technology*. 91: 1845-1850.

Zhu S., Wu Y., Yu Z., Zhang X., Wang C., Yu F., Jin Z., Zhao Y., Xue Y. 2005. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Microwave/alkali pretreated rice straw to ethanol. *Biosystem Engineering*. 92 (2):229-235.

# Optimización del medio de cultivo QBP para la producción de biomasa del consorcio BIOYAF

## Optimization of culture media QBP to the production of biomass of consortium BIOYAF

*Yaima Barrios San Martín<sup>\*1</sup>, Silvia Acosta Días<sup>\*\*</sup>, Francisca González Hernández<sup>\*\*\*</sup>, Ranyer Hayes García<sup>\*\*\*\*</sup>*

### Resumen

La optimización de los medios de cultivo con fines industriales en la mayoría de los casos ha sido efectuada mediante procedimientos empíricos de ensayo y error. Empleando diversos métodos estadísticos es probable que el medio de cultivo original pueda ser optimizado, en muchos casos es posible obtener un medio que no solo sea más productivo, sino de menor o igual costo que el original. Se optimizó el medio de cultivo QBP para el crecimiento de las cepas del consorcio bacteriano BIOYAF capaz de degradar hidrocarburos del petróleo, empleando un Diseño de Factor Categórico Individual para determinar el tiempo de trabajo, un Diseño Factorial ( $2^4$ ) para determinar los rangos de trabajo de concentración de los nutrientes y un Diseño de Superficie de Respuesta para optimizar las concentraciones. Las variables de respuesta de evaluación de los experimentos fueron masa húmeda, masa (UDO), conteo de viables, conductividad, pH y tensión superficial. El tiempo óptimo para el crecimiento de las cepas del consorcio BIOYAF es de seis horas. El medio de cultivo QBP con concentraciones óptimas de fosfato de amonio (3,19 g.l<sup>-1</sup>), sulfato de magnesio (0,04 g.l<sup>-1</sup>), levadura (3,77 g.l<sup>-1</sup>) y sacarosa (47,89 g.l<sup>-1</sup>) permite que la producción de biomasa aumente de 1,540 UDO a 3,082 UDO.

**Palabras clave:** superficie de respuesta, consorcio bacteriano, crecimiento óptimo.

### Abstract

The optimization of culture media with industrial purposes, in most cases, has been made through empirical trial and error procedures. Using different statistical methods original culture media can be optimized, in many cases, is possible to obtain a more productive media, at the same cost as the original one. The culture media QBP was optimized for the growth of the bacterial consortium BIOYAF, which can degrade petroleum hydrocarbons, using a Categorical Individual Factor Design to determine the working time, a Factorial Design ( $2^4$ ) to determine working range of elements concentration and a Surface Response Design to optimize the concentrations. The response variables of the experiments used in this work were: wet mass, mass (UDO), viable's count, conductivity, pH and surface tension. The optimal time for growth of the consortium was of six hours. The optimized QBP culture media (ammonium phosphate: 3.19; magnesium sulphate: 0.04; yeast extract : 3.77; sucrose: 47.89) allowed that the biomass' production increases of 1,540 UDO to 3,082 UDO.

**Key words:** Surface Response Design, bacterial consortium, optimum growth.

**Recibido:** agosto 15 de 2013

**Aprobado:** mayo 5 de 2014

### Introducción

Existen en la literatura diferentes ejemplos sobre técnicas que hacen posible la optimización de los medios

de cultivo. La mayoría de estas basan la formulación de los mismos en la composición elemental del microorganismo a estudiar o de otros similares que puedan

\* Lic. en Microbiología, MSc. en Microbiología. yy@ceinpet.cupet.cu

\*\* Lic. en Microbiología, MSc. en Microbiología. sacosta@ceinpet.cupet.cu

\*\*\* Técnico en Química Industrial. francis@ceinpet.cupet.cu

\*\*\*\* Ing. en Química. ranyer@ceinpet.cupet.cu

1 Centro de Investigaciones del Petróleo. Churrua 468 e/ Vía Blanca y Washington, CP 12 000 Cerro La Habana, Cuba.

servir de referencia para realizar un balance de materia apropiado. Esto puede ser un punto de partida para la formulación y optimización de un medio de cultivo en particular, pero no suficiente ya que el crecimiento celular tiene implícito otros factores que determinan la estequiometría del mismo (Gutierrez y Vara, 2008)

La optimización de los medios de cultivo con fines industriales, en la mayoría de los casos ha sido efectuada mediante procedimientos empíricos de ensayo y error, no sólo en la formulación del medio de cultivo sino también en las condiciones de operación. De cualquier manera es probable que el medio de cultivo original pueda ser optimizado, modificando el porcentaje de los componentes del medio y las materias primas utilizadas, siendo factible en muchos casos optimizar un medio de tal manera que no sea solamente más productivo, sino de menor o igual costo que el original, para lo cual se requiere del uso de varios métodos de optimización (Maddox y Richert, 1977).

La metodología más elemental para la optimización de medios de cultivo consiste en realizar experimentos en los que se varía la concentración del componente a ensayar manteniéndose constante las concentraciones de los demás ingredientes. Para organismos aerobios generalmente se utiliza un sistema de cultivo en erlenmeyers agitados. En este caso, se analiza el efecto de la variable escogida sobre la velocidad de crecimiento y la concentración de biomasa obtenida. Si bien este procedimiento es simple, es evidente que hace falta una gran cantidad de trabajo preliminar ya que el operador no conoce de antemano qué nutriente es el limitante del crecimiento. Cuando son varios los posibles nutrientes limitantes el método resulta poco práctico. Por otra parte, puede ocurrir que la respuesta obtenida al variar la concentración de un componente dependa de los niveles de los otros, o sea, se produzca interacción entre componentes. Se puede mejorar mucho la optimización en *batch* empleando técnicas estadísticas o utilizando sistemas continuos con pulsos de componentes (Dreyer *et al.*, 2000).

Un aspecto relevante en la optimización de un medio de cultivo de interés industrial no es sólo el logro de una formulación racional del medio, sino también la posible inclusión de materia prima de bajo costo que haga rentable el proceso. En este trabajo se empleará el medio QBP, denominación que se le ha dado a un medio de formulación a partir del medio descrito por Núñez (2004), para la producción de biomasa de BIOYAF. Este consorcio está constituido por las cepas *Pseudomonas* sp. B10, *Alcaligenes* sp. F10S1, *Bacillus* sp. F9S y *Bacillus* sp. RFA, todas aisladas de ambientes marinos contaminados con hidrocarburos del petróleo y con alta capacidad de emulsificar y degradar estos compuestos (Barrios, 2011; Barrios *et al.*, 2012).

El objetivo general es optimizar un medio de cultivo para la producción de biomasa celular del consorcio BIOYAF, para lo que se requiere optimizar el tiempo de crecimen-

to del consorcio BIOYAF en medio QBP, así como los componentes del medio de cultivo QBP en función de la variable de respuesta: biomasa (determinada mediante el método turbidométrico-espectrofotométrico)

## Materiales y métodos

### Preparación del consorcio BIOYAF

Las cepas seleccionadas para el consorcio BIOYAF, *Pseudomonas* sp. B10, *Alcaligenes* sp. F10S1, *Bacillus* sp. F9S y *Bacillus* sp. RFA, se sembraron individualmente en 30 ml de medio CTS suplementado con 2 % de NaCl y se incubaron a temperatura ambiente (28-30 °C) en zaranda reciprocante por 24 horas. Los cultivos fueron centrifugados a 5000 rpm (centrífuga modelo soviético ОП-8-042) por 15 min, se decantó el sobrenadante y el pellet se lavó dos veces con solución salina 0,85% en iguales condiciones. El pellet final se re-suspendió en 25 ml de medio de cultivo QBP (Sacarosa 30,0 g.l<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O 0,2 g.l<sup>-1</sup>; NH<sub>4</sub>(2)HPO<sub>4</sub> 5,0 g.l<sup>-1</sup>; Levadura forrajera 1,0 g.l<sup>-1</sup>) y se incubó en las condiciones descritas anteriormente. Para preparar el inóculo se tomaron los cultivos en medio QBP de las cepas a las 18 horas de incubación, estos se centrifugaron y el pellet de cada uno fue lavado como ya se describió en este párrafo, finalmente se re-suspendió cada uno en aproximadamente 20 ml de solución salina 0,85% hasta lograr una concentración en el orden de 10<sup>6</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> según la escala de McFarland (se comprobó mediante la siembra en placa petri por el método en Track Dilution) y luego se mezclaron en un frasco estéril y se homogenizaron por 30 min en zaranda reciprocante.

### Optimización del tiempo de crecimiento

Se empleó un Diseño de Factor Categórico Individual (tabla 1). El estudio se realizó en zaranda empleando la base del medio de cultivo QBP, donde se estudiaron cuatro variables independientes: a) concentración de sacarosa, b) concentración de sulfato de magnesio, c) concentración de fosfato de amonio, y d) concentración de levadura forrajera. Se desarrolló un diseño factorial 2<sup>4</sup> (con una repetición por cada punto). Para el cual se prepararon 14 erlenmeyers de 250 ml con 50 ml de medio QBP, el pH se ajustó a 8 y se les adicionaron 5 ml del inóculo preparado y se incubaron en agitación orbital (150 rpm) a 30 °C. Cada dos horas se tomaron dos erlenmeyers y se evaluó como variable de respuesta principal la masa (Unidades de Densidad Óptica, la absorbancia se determinó en espectrofotómetro Genesys, λ=650 nm inmediatamente después; la levadura forrajera no es soluble en agua aportándole turbidez al medio de cultivo, su presencia implicó que no se pudiera monitorear el crecimiento de forma efectiva



por la medida de la turbidez (UDO), las muestras se conservaron por 24 horas a 4 °C hasta que la levadura sedimentara y transcurrido este tiempo se realizaron las mediciones, se empleó agua destilada como blanco). Además se evaluaron otras variables que permitieron confirmar los resultados obtenidos: conteo de viables (se realizaron diluciones seriadas y se sembró en medio Agar Triptona Soya suplementado con NaCl 2 %, se incubaron durante 24 horas a 30 °C, transcurrido este tiempo se realizó el conteo según la norma ISO 8199:2005 y los valores se reportaron como UFC.ml<sup>-1</sup>); pH (medidor de pH Orion 4 Star); conductividad (medidor de conductividad Orion 4 Star); tensión superficial (Tensiómetro Digital-Tensiometer K10T); masa húmeda (se centrifugaron 50 ml de cultivo en tubos para centrífugas previamente tarados (Mc) , se decantó el sobrenadante y se volvieron a pesar en balanza analítica (Mcp), este proceso también se hizo para una muestra de medio de cultivo sin inocular (Mm) y luego se realizaron los cálculos como se muestra en la ecuación 1, los resultados se expresaron en g.l<sup>-1</sup>). Con el objetivo de verificar si existía correspondencia en la concentración celular medida por turbidimetría a las 24 h y medida por células viables, se tomaron muestras hasta las seis horas de cultivo y se determinó el grado de correlación que existía entre ambas variables. En todos los ensayos los datos experimentales se procesaron empleando el software Statgraphics Centurion XV.

La cinética se desarrolló hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento

$$\text{Ecuación 1: } (M_{cp} - M_c) - (M_m - M_c)$$

**Tabla 1.** Diseño base de la optimización del tiempo de crecimiento del consorcio BIOYAF en el medio de cultivo QBP.

Número de factores experimentales		1
Número de bloques		1
Número de respuestas		6
Número de corridas		14
Grados de libertad para el error		8
Aleatorizar		No
Factor	Niveles	Unidades
Tiempo	7	Horas

Selección de los rangos de trabajo de los nutrientes del medio de cultivo QBP.

Se empleó un Diseño Factorial 2<sup>4</sup> (tabla 2). Se prepararon 32 erlenmeyers de 500 ml con 50 ml de medio QBP con la composición ajustada según el diseño referido en este párrafo, y se inocularon con 5 ml del inóculo preparado (este se preparó como se describió con anterioridad, obviando el paso de resiembra de

las cepas en medio CTS y se incubaron en iguales condiciones que durante la optimización del tiempo de crecimiento. Una vez inoculados se evaluaron las variables absorbancia ( $\lambda = 650 \text{ nm}$ ), pH y conductividad, y luego de 6 h de incubación se evaluaron las mismas variables que durante la optimización del tiempo de crecimiento, exceptuando el conteo de viables.

**Tabla 2.** Diseño base de la selección de los rangos de trabajo de los elementos del medio de cultivo QBP.

Número de factores experimentales			4
Número de bloques			4
Número de respuestas			6
Número de corridas			32
Grados de libertad para el error			20
Aleatorizar			Si
Factores	Bajo	Alto	Unidades
Sacarosa	10,0	30	g.l-1
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,04	0.2	g.l-1
Fosf_amonio	1,0	5	g.l-1
Levadura forrajera	0,1	1	g.l-1

Optimización de la composición de fosfato de amonio, levadura y sacarosa.

Se empleó un Diseño de Superficie de Respuesta (2<sup>3</sup>, Compuesto central en dos bloques) (tabla 3). Se prepararon 18 erlenmeyers de 500 ml con 50 ml de medio QBP a las concentraciones según el diseño empleado, y se añadieron 5 ml del inóculo preparado (este se preparó como se describió para el ensayo anterior) y se incubaron en iguales condiciones que los experimentos realizados hasta el momento. Se evaluaron iguales variables que en el proceso de selección de los rangos de los nutrientes del medio de cultivo.

**Tabla 3.** Diseño base de la optimización de la composición de fosfato de amonio, levadura y sacarosa.

Número de factores experimentales			3
Número de bloques			2
Número de respuestas			6
Número de corridas			18
Grados de libertad para el error			7
Aleatorizar			Si
Factores	Bajo	Alto	Unidades
Sacarosa	20,0	40,0	g.l <sup>-1</sup>
Fosf_amonio	5,0	10,0	g.l <sup>-1</sup>
Levadura forrajera	1,0	3,0	g.l <sup>-1</sup>

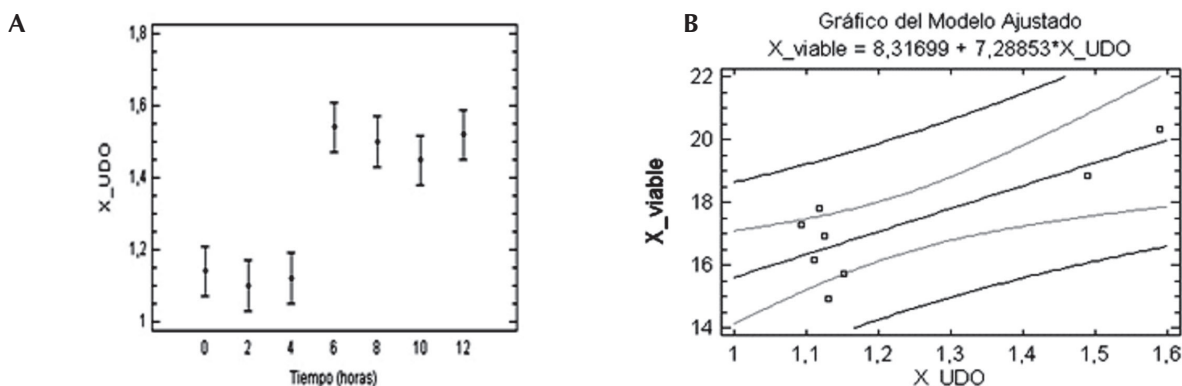
## Resultados y discusión

### Optimización del tiempo de crecimiento del consorcio BIOYAF en el medio QBP

Se seleccionaron los cuatro componentes del medio de cultivo para ser estudiados. En la figura 1 aparece la curva de crecimiento en el medio de cultivo base, la figura 1A muestra el crecimiento bacteriano en UDO en función del tiempo. Se aprecia que alrededor de las 6 h el cultivo entra en la fase de crecimiento estacionario, alcanzándose una concentración celular máxima de 1,540 UDO. El análisis de varianza de clasificación simple de las medias muestran que existe diferencia significativa entre los grupos de tiempos 0, 2, 4 h y 6, 8, 10, 12 h ( $p < 0,05$ ) empleando el método LSD de Fisher; en la figura 1A, también se muestran las desviaciones estándares.

En la figura 1B se muestra la ecuación de predicción de la concentración de células viables en función de la absorbancia ( $\lambda=650\text{nm}$ ) medida a las 24 horas; se puede apreciar que el factor de correlación es 0,87, lo que indica que existe una relación moderadamente fuerte entre la concentración celular por UDO y las células viables. El valor  $p=0,2429$  para el estadístico de Durbin-Watson permite concluir que no hay una autocorrelación serial en los residuos con un nivel de confianza del 95,0%.

Cuando se graficaron los valores de pH y conductividad (datos no mostrados), se obtuvieron mesetas en el periodo de 0 a 4 h, y posteriormente, una brusca disminución de los mismos en el periodo de 4 a 6 h, correspondiéndose con el tiempo de la fase exponencial del crecimiento del consorcio BIOYAF. Teniendo en cuenta estos resultados se determinó trabajar el resto de los experimentos con seis horas de cultivo, manteniendo las condiciones de agitación y temperatura.



**Figura 1.** Curva de crecimiento del consorcio BIOYAF en la condición base del medio de cultivo QBP. **A:** Crecimiento bacteriano.  $X_{absorbancia}$  ( $\lambda=650\text{ nm}$ , 24 horas después de tomadas las muestras) en función del tiempo; se muestran las barras de LSD de Fisher para un 95% de confianza. **B:** Gráfico de correlación entre UDO y células viables en las primeras 6 h de cultivo, se observa en la parte superior la ecuación de ajuste.

### Selección de los rangos de trabajo de los elementos del medio de cultivo QBP

La variante con concentración de sacarosa ( $30,0\text{ g.l}^{-1}$ ), sulfato de magnesio ( $0,2\text{ g.l}^{-1}$ ), fosfato de amonio ( $5,0\text{ g.l}^{-1}$ ) y levadura forrajera ( $1,0\text{ g.l}^{-1}$ ) es el control del experimento, esta se corresponde con el medio de cultivo empleado en el proceso base. Los resultados del experimento se muestran en la figura 2, en la 2A se observan los efectos de las concentraciones del fosfato de amonio y de la levadura forrajera; y en la 2B el gráfico de Pareto.

En este experimento se observó que las concentraciones de fosfato de amonio, levadura y sacarosa tuvieron una influencia positiva sobre el crecimiento; a su vez, se apreció una interacción positiva entre las concentraciones de fosfato de amonio y de levadura, mientras que la concentración de sulfato de magnesio resultó ser no significativa, así como el resto de las interacciones, lo que se puede observar en el modelo descrito a continuación:

$$X_d = 0,176167 - 0,00162708 \cdot \text{Sac} - 1,01111 \cdot \text{Mag} + 0,0258472 \cdot \text{F\_am} - 0,000416667 \cdot \text{Lev} + 0,0446875 \cdot \text{Sac} \cdot \text{Mag} + 0,00044375 \cdot \text{Sac} \cdot \text{F\_am} - 0,000416667 \cdot \text{Sac} \cdot \text{Lev} + 0,103125 \cdot \text{Mag} \cdot \text{F\_am} - 0,826389 \cdot \text{Mag} \cdot \text{Lev} + 0,164028 \cdot \text{F\_am} \cdot \text{Lev}$$

donde: Sac: sacarosa, F\_am: fosfato de amonio; Lev: levadura forrajera; Mag: sulfato de magnesio

La mejor variante (nivel alto de concentración de sacarosa, fosfato de amonio y levadura, y nivel bajo de sulfato de magnesio) permite aumentar 1,58 veces la concentración celular, respecto al nivel básico. Este resultado indica que para lograr un alto crecimiento microbiano se requieren aumentar las concentraciones de fosfato de amonio, levadura y sacarosa, mientras la de sulfato de magnesio se puede mantener en su valor bajo.

### Optimización de la composición de fosfato de amonio, levadura y sacarosa

Se realizó un estudio con un diseño factorial de superficie de respuesta del tipo compuesto central en dos bloques (con 3 factores y 2 puntos centrales por bloque) para concentraciones de sacarosa en un intervalo de 20,0 – 40,0 g.l<sup>-1</sup>, fosfato de amonio de 5,0 - 10,0 g.l<sup>-1</sup>, y de levadura de 1,0 – 3,0 g.l<sup>-1</sup>; en todos los casos los intervalos están en correspondencia con el estudio anterior. En la figura 3 se muestran los resultados del ensayo, la 3A describe la superficie de respuesta obtenida para el crecimiento del consorcio BIOYAF y en la figura 3B se muestra el gráfico de Pareto.

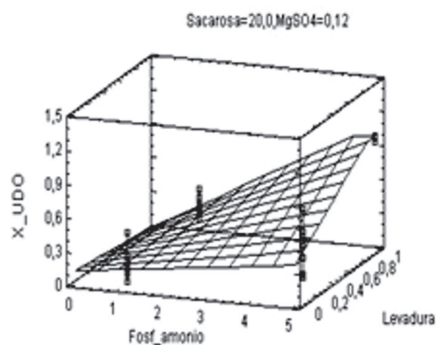
Estos resultados demostraron que los efectos principales (de primer orden) concentraciones de levadura y sacarosa influyen positivamente sobre la producción de biomasa del consorcio BIOYAF, así como la interacción de estos dos factores, sin embargo, solo el efecto

de la levadura se considera significativo. La concentración de fosfato de amonio y el efecto cuadrático de la concentración de levadura influyeron negativamente, siendo este último el único significativo de los dos, esto además indica que la concentración de levadura no se puede aumentar indefinidamente, pues en un punto dejará de ser positivo el efecto que provoca en el crecimiento microbiano.

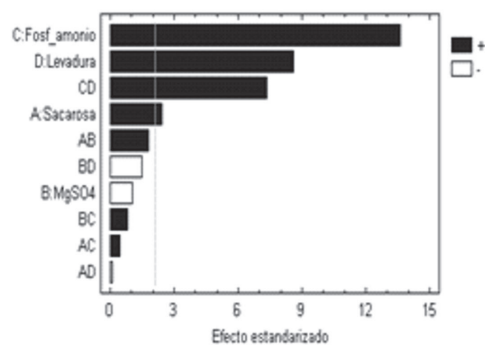
Este resultado revela la existencia de un óptimo de concentración de sacarosa, fosfato de amonio y levadura donde la concentración de biomasa se hace máxima, y para determinar ese punto se eliminaron los efectos no significativos, alcanzándose el siguiente modelo:

$$X_d = 0,120197 + 0,0484666 * \text{Sac} + 0,283649 * F_{\text{am}} + 0,381163 * \text{Lev} - 0,000668754 * \text{Sac}^2 - 0,003715 * \text{Sac} * F_{\text{am}} + 0,0158625 * \text{Sac} * \text{Lev} - 0,0141002 * F_{\text{am}}^2 - 0,00455 * F_{\text{am}} * \text{Lev} - 0,149375 * \text{Lev}^2$$

A

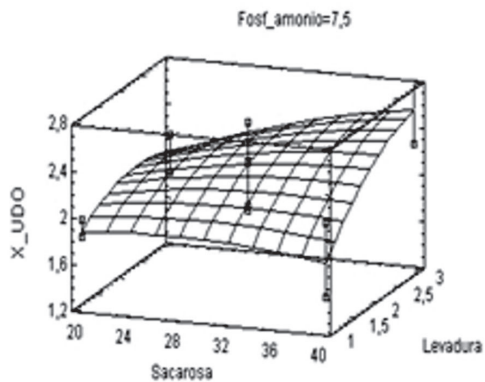


B

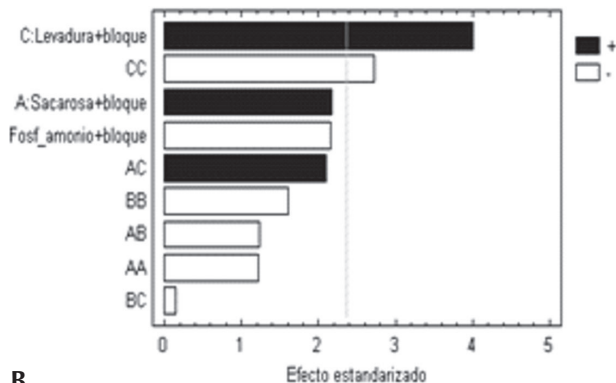


**Figura 2.** Selección de rangos de trabajo de los elementos del medio de cultivo QBP. **A:** Superficie de respuesta estimada para la producción de biomasa del consorcio BIOYAF en función de la concentración de fosfato de amonio y levadura forrajera. Los puntos representan el resultado primario experimental y las barras la distancia hasta la superficie de respuesta estimada. **B:** Gráfico de Pareto para el análisis de la significancia estadística de los factores para una probabilidad de 90%

A



B



**Figura 3:** Optimización de la composición de fosfato de amonio, levadura y sacarosa. **A:** Superficie de respuesta estimada para la producción de biomasa del consorcio BIOYAF en función de la concentración de sacarosa y levadura forrajera. Los puntos representan el resultado primario experimental y las barras la distancia hasta la superficie de respuesta estimada. **B:** Gráfico de Pareto para el análisis de la significancia estadística de los factores para una probabilidad de 90%.

donde: Sac: sacarosa, F<sub>am</sub>: fosfato de amonio; Lev: levadura forrajera

Acorde con la optimización, el máximo de concentración de biomasa en función de la absorbancia a  $\lambda = 650$  nm (3,082 UDO) corresponde a una concentración de sacarosa, fosfato de amonio y levadura de 47,89 g.l<sup>-1</sup>, 3,38 g.l<sup>-1</sup> y 3,79 g.l<sup>-1</sup>, respectivamente. Esto significa el aumento en dos veces de la producción de biomasa con el medio en su condición base.

## Conclusiones

Se determinó que el tiempo óptimo para el crecimiento de las cepas del consorcio BIOYAF es de 6 h.

Las concentraciones óptimas de fosfato de amonio (3,19 g.l<sup>-1</sup>), sulfato de magnesio (0,04 g.l<sup>-1</sup>), levadura (3,77 g.l<sup>-1</sup>) y sacarosa (47,89 g.l<sup>-1</sup>) en la formulación del medio de cultivo QBP permiten aumentar la producción de biomasa a 3,082 UDO.

## Referencias bibliográficas

- Barrios Y., Acosta S., Sánchez A., Toledo A., González F., García R. 2012. Study and isolation of aerobic hydrocarbon-degrading bacteria from Cuban shorelines. *Biotecnología Aplicada*. 29: 80-86.
- Barrios Y. 2011. Obtención de un consorcio bacteriano para la remoción de hidrocarburos del petróleo. Universidad de La Habana, Tesis de Maestría.
- Dreyer A., Coello N., Montiel E., 2000. Utilización de la metodología de superficie de respuesta de la optimización de un medio de cultivo para la producción de L-lisina por *Corynebacterium glutamicum*. *Agronomía Tropical*. 50: 167-188.
- Gutierrez H.; de la Vara R. 2008. Análisis y diseño de experimentos. México DF : McGraw-Hill Interamericana.
- Maddox I., Richert S. 1977. Use of response surface methodology for the optimization of microbiological media. *J. Appl. Bacteriol.* 43: 197-204.
- Núñez R. 2004. Obtención, caracterización y aplicación de un bio-producto bacteriano para la biorremediación de derrames de hidrocarburos. Universidad de La Habana, Tesis de Doctorado.



# Consorcio microbiano nativo con actividad catalítica para remoción de índigo y surfactantes en agua residual industrial textil a través de una matriz de inmovilización

## Microbial consortium native catalytically active for removal of indigo and surfactants in textile industry wastewater through an immobilization matrix

*Liliana Guerrero Porras<sup>\*</sup>, Elizabeth Serna<sup>\*\*\*</sup>, Santiago Cardona Gallo<sup>\*\*</sup>, Gloria Cadavid -Restrepo<sup>\*\*\*</sup>, Camilo Suárez<sup>\*\*\*</sup>, Luz Quintero-Rendón<sup>\*\*</sup>*

### Resumen

El siguiente estudio tuvo como objetivo aislar seis diferentes cepas bacterianas provenientes de las descargas de agua utilizadas en la tintura de hilo con colorante índigo, que tuviesen capacidad de degradación de compuestos orgánicos del tinte índigo y tres surfactantes de tipo no iónicos. Igualmente, se evaluaron diferentes medios de soporte para inmovilizar las cepas seleccionadas. Las cepas con mejor capacidad de decoloración se combinaron para conformar cuatro consorcios (I, II, III, y IV) con el fin de potenciar el proceso de decoloración, considerando que la sinergia y el complemento de actividades metabólicas de cultivos mixtos dentro de una comunidad microbiana incrementan la eficiencia de remoción de carga orgánica. Los porcentajes de remoción que se alcanzaron fueron 64, 73, 76 y 59 %, respectivamente. Los cultivos individuales no presentaron porcentajes de remoción superiores a los reportados por los consorcios, lo que permite pensar en su utilización para la remoción de tintes índigos en aguas residuales.

**Palabras claves:** aislamiento, biodegradación, índigo, surfactantes no iónicos, consorcio bacteriano.

### Abstract

The aim of this study was isolate six different bacterial strains from water discharges used in dyeing yarn with indigo, capable of degradation of organic compounds with indigo dye and three type nonionic surfactants. Similarly, various supporting media were evaluated for immobilizing the selected strains. Strains with better capacity were combined to form four consortia (I, II, III, and IV) in order to enhance the bleaching process, whereas synergy and complement metabolic activities of mixed cultures within a community increase microbial removal efficiency of organic load. Removal percentages were achieved which were 64, 73, 76 and 59%, respectively. Individual cultures showed no higher than rates reported by consortia removal, which suggests in its use for the removal of indigo dyes in wastewater.

**Key words:** Isolation, biodegradation, indigo, nonionic surfactants, bacterial consortium.

**Recibido:** marzo 18 de 2013

**Aprobado:** mayo 7 de 2014

### Introducción

La industria textil es uno de los sectores que más contribuye en la contaminación medio ambiental, pues maneja grandes volúmenes de agua por unidad de producto, así como una composición química y orgánica

de alto riesgo para los cuerpos de agua receptores (Ministerio del Medio Ambiente, 2002). Los principales contaminantes químicos presentes en aguas residuales textiles son los tintes que contienen aminas cancerígenas, metales pesados tóxicos, pentaclorofenol,

\* Departamento de Geociencias y Medio Ambiente.

\*\* Departamento de Procesos y Energía Facultad de Minas. gecadavi@unal.edu.co, casuarezmendez@unal.edu.co, laquinte@unal.edu.co

\*\*\* Facultad de Ciencias. Grupo de Microbiodiversidad y Bioprospección, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Tel: (57-4) 425 51 20. lguerre@unal.edu.co, esernao@unalmed.edu.co, scardona@unal.edu.co

blanqueadores con cloro, compuestos orgánicos halogenados absorbibles (AOX), surfactantes, formaldehído libre, biocidas, retardantes de fuego, suavizante no neutros y sales (Correia *et al.*, 1994).

Esta industria emplea una gran variedad de tintes entre los que se encuentran los de tipo tina, usados ampliamente para teñir tejidos de algodón (particularmente el índigo es el tinte comúnmente usado para la manufactura del denim). Para este tipo de tintes se estima que queda sin fijarse entre el 5 y el 20% de ellos en las tinajas y son desechados. Algunos de estos tintes y subproductos son carcinógenos y mutagénicos, deterioran estéticamente los cuerpos de agua e impactan negativamente la flora y la fauna (Robinson *et al.*, 2002). Numerosos estudios se han enfocado en el tratamiento de los efluentes textiles centrándose principalmente en el desarrollo de un proceso de degradación eficiente y rentable. Los métodos actualmente utilizados incluyen procesos físicos, químicos y biológicos. Para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con colorantes se ha empleado una amplia gama de procesos como son adsorción, neutralización, coagulación, degradación química, y degradación fotocatalítica, ozonación, filtración por membrana e intercambio iónico (Forgacs *et al.*, 2004). Sin embargo, en la mayoría de las ocasiones estos tratamientos tienen problemas operacionales, generan grandes cantidades de lodo y poseen altos costos, además de generar subproductos que pueden llegar a ser más tóxicos que el contaminante inicial (Robinson *et al.*, 2001).

Los tratamientos biológicos han sido reconocidos como métodos efectivos para el proceso de decoloración y degradación de colorantes en aguas residuales industriales altamente contaminadas. Adicionalmente, se consideran muy efectivos ya que son tratamientos amigables con el medio ambiente, de baja producción de lodos y competitivos con relación a los costos requeridos (Banat *et al.*, 1996). Entre las diversas técnicas, la biodegradación es considerada actualmente la alternativa menos costosa para transformar contaminantes presentes en diversos ecosistemas, teniendo en cuenta que gran variedad de bacterias cuentan con la maquinaria enzimática para transformar los compuestos xenobióticos persistentes, y éstas pueden ser aisladas de lugares donde ha existido previa exposición al contaminante (Tony *et al.*, 2009). Actualmente, para la decoloración y mineralización de los colorantes presentes en dichas aguas, son usados sistemas aerobios, anaerobios y combinados (Shaw *et al.*, 2002), con hongos (Prigione *et al.*, 2008; Kaushik y Malik, 2009) y bacterias (Jadhav *et al.*, 2010). Se han reportado estudios en donde se emplean bacterias capaces de remover tintes, ya sea en cultivos puros o en consorcios (Pearce *et al.*, 2003; Khehra *et al.*, 2005). La utilización de consorcios microbianos ofrece considerables ventajas sobre el uso de cultivos puros en la degradación de tintes sintéticos (Moosvi *et al.*, 2006). Las distintas cepas pueden atacar la molécula de colorante en dife-

rentes posiciones, o pueden utilizar los productos de la descomposición de la molécula del tinte (Kuhad *et al.*, 2004). En investigaciones realizadas con un tratamiento aerobio se logró la remoción de 80 – 96 % de color para tintes tipo azo con glucosa como co-sustrato a una concentración de 1.3 g/l empleando un consorcio bacteriano proveniente de una planta de tratamiento de agua industrial textil (Tony *et al.*, 2009). Khehra *et al.* (2005) lograron la decoloración de tintes tipo azo sin la utilización de co-sustratos alcanzando hasta 99% de remoción de color. Se han empleado tratamientos anaerobios, donde se alcanza la decoloración total del efluente con índigo carmín en un periodo de 18 días, empleando una población mixta de bacterias y usando como co-sustrato acetato, un aditivo que es frecuentemente usado en la industria textil (Fisher-Colbrie *et al.*, 2005). En la búsqueda del escalado del proceso también se ha estudiado el proceso a nivel piloto, donde se utilizó un sistema combinado que consta de un reactor aerobio de tanque agitado continuo y un biorreactor de película fija alimentado con índigo (C.I.Vat Blue 1), los biorreactores fueron inoculados por un consorcio microbiano aclimatado; este sistema alcanzó el 97,5 % de remoción de color (Khelifi *et al.*, 2008).

## Materiales y métodos

En este trabajo se determinaron los parámetros más importantes para la decoloración de un efluente textil simulado, empleando un consorcio bacteriano para potenciar la remoción de color del efluente, el cual es considerado un medio de alta complejidad química ya que los métodos para fijar el color índigo son mecanismos de óxido reducción difíciles debido a la insolubilidad del índigo en agua. El índigo puede ser reducido por agentes reductores fuertes como el ditionito de sodio (llamado también hidrosulfito de sodio -  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) usado para la preparación del agua sintética (Prideaux, 2003). La reducción se da en presencia de un medio alcalino alto (pH 11-14) por hidróxido de sodio, sales metálicas, y solución de potasio. Se utilizaron surfactantes no iónicos etoxilados para mantener soluble el índigo en agua. Para la simulación del efluente utilizado en este trabajo se emplearon tres tensoactivos no iónicos: surfactante A, surfactante B y surfactante 1, los que se denominaron disp. A, disp. B y disp. 1, respectivamente.

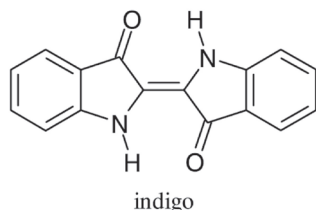
Este estudio incluye, además, el análisis de los parámetros físicos y químicos del proceso de decoloración. Para lo cual se realizaron diferentes ensayos de decoloración, empleando seis cepas aisladas de un efluente textil real, que fueron posteriormente cultivadas en un efluente simulado y de allí se seleccionaron las cepas con mayor porcentaje de remoción en cultivo individual. A continuación, se combinaron para seleccionar el consorcio que alcanzara el mejor porcentaje de remoción, con el objetivo de llevarlo a un siguiente tratamiento en una planta piloto de un sistema trifásico llevado a cabo en un biorreactor de lecho fluidizado.

## Colorantes y químicos

- Tinte: C.I. Vat Blue 1, color índigo, de fórmula química  $C_{16}H_{10}N_2O_2$  y estructura molecular presentada en la figura 1, C.I. No. 73000, CAS No. 482-89-3; fabricado por INDIGO\_ASH\_PACIFIC y proporcionado por la industria textilera Fabricato (Medellín, Colombia).
- Surfactantes: Surfactante A: Alcohol ceto estearílico de 23 moles de óxido de etileno, de fórmula química  $C_{34}H_{72}O_2$ . Surfactante B: Alcohol tridesílico de 6 moles de óxido de etileno. Surfactante 1: NOVASINTEX DS SS. Los tres surfactantes fueron proporcionados generosamente por Colorquímica S.A. (Medellín, Colombia). En la tabla 1 se presentan las características de cada uno de ellos.
- Ditionito de Sodio: Producido y adquirido en Químicos JM, (Medellín, Colombia).
- Los componentes del medio de cultivo fueron cedidos gentilmente por el Laboratorio de Microbiología Industrial, Universidad Nacional, Sede Medellín.

## Medio de cultivo

Se preparó el medio de crecimiento BH (Bushnell Haas Broth) (pH 7.0 a 25°C) con los siguientes reactivos en g/l:  $MgSO_4$ , 0.2;  $K_2HPO_4$ , 1.0;  $CaCl_2$ , 0.02;  $FeCl_3$ , 0.05;  $(NH_4)_2NO_3$ , 1.0. Dado que el medio no contiene fuente de carbono orgánica, se adicionó el color índigo



**Figura 1.** Estructura molecular del color índigo

(contaminante) como fuente de carbono y energía al 1% y 10% V/V. Este medio se preparó en forma sólida y líquida. El índigo y el medio suplementado fueron esterilizados a 121°C y 15 psi durante 15 minutos y luego inoculados con la muestra del efluente.

## Bacterias para decoloración de efluente textil

Para desarrollar el consorcio microbiano nativo capaz de decolorar tinte índigo, se tomaron muestras de líquido y sedimento del efluente de una planta de teñido de índigo. Las muestras fueron conservadas en glicerol al 20% en una proporción 1:1 a una temperatura de -20°C. Se realizaron diluciones seriadas de dichas muestras hasta  $10^{-3}$  en medio BH suplementado al 1% y 10% V/V con índigo y a dos pH diferentes, 7,9 y 11, ajustado con hidróxido de sodio. El tinte índigo fue adicionado posteriormente al medio, luego de su esterilización a través de un filtro de tamaño de poro de 0.22 micras esterilizada a 120°C y 15 psi por 15 minutos. Estas muestras fueron mantenidas en medio aerobio a una agitación constante de 130 rpm y a una temperatura de 30°C por dos semanas. Los tubos se examinaron diariamente y fueron comparados con un blanco que no contenía el inóculo de la muestra de agua. Las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  fueron cultivadas por dispersión en medio sólido BH alrededor de 10 días utilizando 20% de agar para la siembra en placa. Éste procedimiento se realizó por triplicado y se monitoreó el crecimiento a las 48 y 72 horas. A partir de las placas se inoculó por el método de siembra de dispersión 2 ml/placa y se realizó una siembra en placa para lograr disminución de densidad y diferenciación morfológica.

## Aislamiento y caracterización

Con los cultivos primarios obtenidos, se realizó el aislamiento bacteriano a partir del crecimiento en placa de cuatro cepas a pH 7 suplementado con índigo filtrado. Se tomaron las colonias aisladas para aumentar su densidad poblacional y realizar caracterización morfológica.

**Tabla 1.** Características de los tensoactivos empleados

Nombre tensoactivos	Características
<b>A</b> Alcohol ceto estearílico de 23 moles de óxido de etileno	Alcohol lineal etoxilado, fórmula general $RO(CH_2-CH_2-O)N-H$
<b>B</b> Alcohol tridesílico de 6 moles de óxido de etileno	
<b>C</b> NOVASINTEX DS SS	Es un producto auxiliar de tintura con propiedades de coloide protector, dispersante y secuestrante de iones calcio en tinturas con colorantes directos, dispersos, sulfurosos, tinas, etc.

ca a través del test tinción de Gram. Las cepas aisladas fueron guardadas en glicerol al 20%.

### Ensayos de decoloración

Las cepas aisladas fueron crecidas en los medios y las condiciones de cultivo descritos anteriormente, por períodos de tiempo establecidos. Los ensayos se desarrollaron centrifugando las muestras durante 15min a 8000g y colectando el sobrenadante. La lectura de la absorbancia se realizó usando un espectrofotómetro a una longitud de onda máxima de 650nm sugerida para el color índigo, utilizando agua destilada como blanco y empleando una curva de calibración construida con el agua residual sintética de concentración conocida.

### Evaluación del consorcio

#### Medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo BH (Bushnell Haas Broth) (pH 7.0 a 25°C) adicionando como fuente de carbono el color índigo sintético preparado en baño de tina y tres surfactantes. Las concentraciones de los componentes en el efluente sintético variaron en los experimentos realizados. Las relaciones óptimas utilizadas en los últimos ensayos que cumplían con las características del efluente real fueron: Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, 150 mg/l, surfactante A sólido 16 mg/l, surfactante B líquido 12 mg/l, surfactante 1, dispersión 12 mg/l e índigo a 50 mg/l. El efluente sintético fue utilizado en los experimentos en medio sólido y medio líquido. El efluente y el medio suplementado fueron esterilizados a 121°C y 15 psi durante 15 minutos.

#### Selección de cepas con mejor actividad de decoloración

Los aislamientos seleccionados fueron reactivados en medio sólido Luria-Bertani (LB) durante un periodo de 24 a 48 horas. Se tomó muestra de cada una de las cepas y se realizó siembra en 15 ml de medio BH enriquecido con índigo a 50 mg/l, los viales se incubaron a 30° y 130 rpm. El número de viales que se incubaron fue igual al número de muestras tomadas, de forma que cada vial se abrió una sola vez. El control no inoculado se incubó también para comprobar la decoloración abiótica del medio de contraste.

#### La eficiencia de decoloración de los aislamientos

La longitud de onda de absorción máxima del tinte índigo, 670 nm, fue espectrofotométricamente medida rastreando el espectro visible entre 400 y 700 nm y utilizando agua destilada como blanco, con el espectrofotómetro DR 2700 marca HACH. Los experimentos de decoloración con las cepas aisladas fueron llevados a cabo en cultivo discontinuo por 21 días de tra-

tamiento. En este procedimiento solo se tomaron dos mediciones a cada una de las cepas, al inicio y al final del proceso. La eficiencia de decoloración de las diferentes cepas se determinó por la siguiente ecuación (Robinson *et al.*, 2002).

$$\text{Decoloración (\%)} = \frac{(I - F)}{I} \times 100$$

Donde

I: absorbancia inicial

F: absorbancia del medio decolorado (final)

### Desarrollo del consorcio

A partir del ensayo anterior, se seleccionaron los aislamientos que presentaron los mayores porcentajes de remoción de color, los cuales se nombraron C1, C2, C3, C4, C5 y C6, y se utilizaron para el desarrollo del consorcio. Cada uno de los aislamientos se cultivó en caldo LB durante 48h con el fin de tener una alta concentración celular en menor tiempo, se ajustó la concentración celular del inóculo a 1.0 (DO) leída a 540 nm. En la tabla 2 se presentan las combinaciones de cepas para la construcción del consorcio. Se sembró 1 ml de cada una de las cepas en un volumen final de 30 ml de caldo BH enriquecido con índigo a 50 mg/l. Posteriormente, se incubó a 30°C y 130 rpm. De esta prueba se seleccionó el consorcio que pudiese alcanzar el más alto porcentaje de remoción de color.

**Tabla 2.** Combinación de cepas para el desarrollo del consorcio.

Consortio	Cepas
I	C1, C5, C6
II	C1, C4, C5
III	C1, C2, C5, C6
IV	C5, C6

### Ensayo de biodegradabilidad de los surfactantes en el efluente sintético

Los surfactantes presentes en la solución, por su naturaleza orgánica, representan otra fuente de carbono para las bacterias. Por esta razón se realizó el siguiente ensayo: se sembró cada una de las cepas en medio BH enriquecido con cada uno de los surfactantes y en una mezcla de estos, en medio sólido, a las mismas concentraciones de la preparación del efluente simulado, surfactante (A) sólido 16 mg/l, surfactante (B) líquido 12 mg/l, surfactante (1), dispersión 12 mg/l. La medición de crecimiento se realizó de manera cualitativa por un periodo de 12 días a temperatura ambiente (25°C).



## Evaluación de material de soporte

Se evaluó el comportamiento bacteriano de los siguientes materiales propuestos para ser utilizados en el reactor biológico de lecho fluidizado. Vidrio residual (poliestireno cristal de alta densidad, transparente, homopolímero obtenido directamente de la polimerización del estireno, figura 2), plástico reciclado (de colores y de baja densidad), plástico reciclado (color negro, baja densidad y poroso) y carbón antracita.

El poliestireno cristal (vidrio residual) y los plásticos fueron esterilizados a 120°C y 15 psi por 15 min. Dos tipos de experimentos fueron llevados a cabo. El primero de los ensayos se desarrolló impregnando sobre el material de soporte dispuesto sobre un medio sólido un pre inoculo en medio BH acondicionado por 15 días a una agitación y temperatura constante (130 rpm y 30°C). El segundo ensayo se desarrolló agregando al pre-inóculo desde su momento inicial de cultivo el material de soporte a una agitación de 130 rpm y a una temperatura de 30°C constante durante 15 días y luego se colocaron en condiciones estériles sobre el medio BH sólido. La evaluación del material de soporte con respecto al crecimiento bacteriano se realizó cualitativamente.

La antracita fue evaluada tomando una mezcla de las 6 cepas aisladas, esta mezcla se reactivó en medio LB durante 12h, se agregó al medio de cultivo el soporte de inmovilización. Previamente la antracita fue lavada en repetidas ocasiones, incinerada a 550° C por 1 hora, lavada nuevamente, secada a 105° C y esterilizada a 121°C y 15 psi durante 15 minutos. Se incubó durante 48 h el medio de cultivo inoculado en presencia de antracita. Posterior a este período, se tomaron partículas de soporte y se llevaron a medio LB sólido para observar el crecimiento sobre y alrededor del soporte.

## Resultados y discusión

### Aislamiento de cepas

A partir del muestreo inicial del efluente se obtuvieron dos muestras, denominadas líquido y sedimento, que fueron activadas y cultivadas en medio BH. Sin embargo, se decidió trabajar en sus etapas posteriores con la muestra procedente de medio líquido debido a que proporcionó una mayor variedad bacteriana.

Análisis posteriores de los experimentos realizados en laboratorio, permitieron implementar la fuente alterna de carbono esterilizada en autoclave como otra forma de garantizar la desinfección en vez de usar el índigo filtrado como sugieren varios autores. A partir de las diluciones seriadas se determinó que para posteriores experimentos solo es necesario diluir hasta 10<sup>-2</sup>.

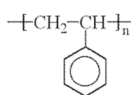


Figura 2. Fórmula del poliestireno

Los resultados de los protocolos microbiológicos permiten proponer que se requiere un periodo de adaptación en cultivo en suspensión alrededor de 15 días a temperatura de 30 °C y 130 rpm, ya que las cepas iniciales en índigo filtrado fueron repicadas en medio sólido, cambiando el pH de 7 a 11 sin una adaptación previa en cultivo en suspensión y de este proceso, aproximadamente la mitad de las bacterias se adaptaron al cambio de pH, las demás no presentaron crecimiento.

Con el aumento del pH en el medio sólido se evidenció un pardeamiento gradual, este hecho se presentó posiblemente debido a la oxidación de los metales del medio, lo que se observó en el medio líquido como una mayor precipitación de sales. El crecimiento de las cepas se presentó con rapidez a los pH 7 y 9; lo que no sucedió a pH 11, contrario a lo que se esperaba según las condiciones de alcalinidad en el efluente comercial (pH 11.78). Para la identificación de las bacterias, se trabajó a un pH de 7 tanto para medio sólido como para medio líquido y se propuso como el pH óptimo para trabajar en las técnicas de bioestimulación y en la operación de la planta de tratamiento de agua residual.

Los tiempos de cultivo en placa con el cambio de índigo filtrado a índigo esterilizado en autoclave se duplicaron a un promedio de 10 días. Además por resultados previos la adaptación en suspensión se presenta a los 15 días.

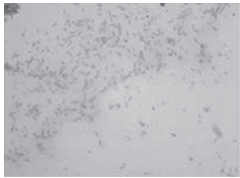
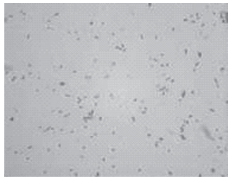
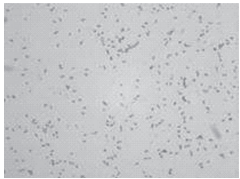
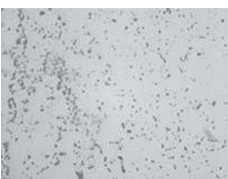
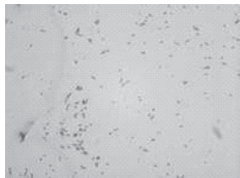
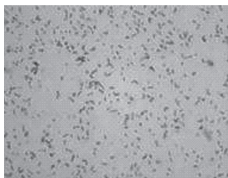
### Aislamiento y caracterización

Fueron aisladas seis cepas, cuyo desarrollo se presenta en la tabla 3. Estas cepas presentaron buen crecimiento a los pH 7 y 11 con las siguientes características:

- 1s: Puntiforme, borde regular, brillante, muy pequeña y no forma agregados.
- 2L: Borde irregular, cremosa, elevación acuminada, borde ondulado. Mayor tamaño.
- 3l: Borde entero, brillante, elevación convexa evidencia de un poco acuminada.
- 4l: Circular, convexa, borde entero, brillante y cremosa-
- 5p: Puntiforme y brillante. La de menor tamaño, borde entero
- F: Con apariencia igual a 2L. En la tinción Gram se verificó su diferencia.

La realización del frotis y la fijación de la muestra para tinción de Gram fueron determinantes para la identificación bacteriana, ya que las bacterias encontradas que usaron el índigo como fuente de carbono tuvieron un tamaño particularmente pequeño. En la tinción de Gram se obtuvieron cinco cepas Gram negativas y una Gram positiva (tabla 3).

**Tabla 3.** Cepas caracterizadas a través de la tinción Gram

Cepa	Tinción Gram	Cepa	Tinción Gram
1s		4l	
2l Gram +		5p	
3l		F	

### Ensayos preliminares de decoloración

Para obtener el consorcio microbiano óptimo se implementó un ensayo inicial de decoloración con 4 cepas. La medición de absorbancia a 610 y 600 nm en periodos de 24 horas de cultivo, tiempos de (0, 24, 48) fue registrada. El blanco usado para esta prueba fue el tiempo cero. Los resultados con datos negativos sugirieron implementar un blanco con una concentración baja (posiblemente agua destilada), ya que los resultados, que se presentan en las tablas 4, 5, 6, dificultan la interpretación de los datos.

**Tabla 4.** Ensayos preliminares de decoloración.

%/Concentración final g/ml	Absorbancia 620	Absorbancia 650
1% 3.4*10 <sup>-5</sup>	0,019	0,025
5% 1.7*10 <sup>-4</sup>	0,098	0,0132
10% 3.4*10 <sup>-4</sup>	0,048	0,051
15% 5.1*10 <sup>-4</sup>	0,055	0,058
25% 8.5*10 <sup>-4</sup>	0,082	0,092
33% 1.122*10 <sup>-3</sup>	0,068	0,071
40% 1.36*10 <sup>-3</sup>	0,063	0,066
55% 1.87*10 <sup>-3</sup>	0,0107	0,116
60% 2.04*10 <sup>-3</sup>	0,100	0,0108
90% 3.06*10 <sup>-3</sup>	0,088	0,094
Muestra AR industrial		

Realizado a través de  $C_1V_1=C_2V_2$ , con volumen final 1%, 5%, 10%, 15%, 25%, 33%, 40%, 55%, 60% y 90% V/V (indigo/agua).

### Evaluación de consorcio

#### Selección de cepas con mejor actividad de decoloración

Las cepas seleccionadas fueron revisadas por su capacidad para decolorar índigo C.I.Vat Blue 1 (50 mg/l) en el caldo BH. Los aislamientos no identificados alcanzaron los porcentajes de remoción que muestra la tabla 7. No se verificó acumulación de tinte por las bacterias manteniéndose la hipótesis de que usan como fuente de carbono tanto el colorante como los dispersantes presentes en el efluente simulado. La eficiencia en la decoloración del tinte por las cepas aisladas de muestras tomadas del efluente de una planta de teñido de índigo, indica la adaptación natural de estos microorganismos para sobrevivir en la presencia de colorantes tóxicos. Este resultado es similar al reportado por Chen *et al.* (2003), quienes reportaron el aislamiento y la detección de microorganismos capaces de decolorar tintes tipo azo a partir de diferentes muestras de lodo recogido de una planta de tratamiento de aguas residuales.

#### Remoción de color por los consorcios

La combinación de cepas (consorcios) basados en diferentes combinaciones de cinco de los seis aislamientos fueron probados para determinar su eficiencia en la decoloración del efluente simulado. Los resultados presentados en la tabla 8 muestran que el consorcio denominado III, aumentó significativamente la eficiencia de decoloración de índigo a 50 mg/l. El consorcio III alcanzó un porcentaje de decoloración de 76 %

mientras que la cepa pura que mayor porcentaje alcanzó fue de 70%, por lo cual el consorcio es una muy buena alternativa. El potencial de actividad metabólica concertada de las poblaciones microbianas para decolorar aguas residuales de la industria textil ha sido reportado por Manu y Chaudhari (2003), donde con un tratamiento anaerobio, empleando un cultivo mixto, se alcanzó una decoloración de hasta un 90% del colorante índigo añadido.

**Tabla 7.** Porcentajes de remoción de color por cada una de las cepas después de 21 días de tratamiento.

Cepas aisladas	(%) de remoción
C1	70
C2	67
C3	43
C4	63
C5	64
C6	69

**Tabla 8.** Eficiencia de los consorcios

Consorcio	Cepas	(%) de remoción
I	C1, C5, C6	64
II	C1, C4, C5	73
III	C1, C2, C5, C6	76
IV	C5, C6	59

#### Selección del consorcio con mejor actividad de remoción de color

El consorcio que alcanzó mayor porcentaje de remoción de color, fue el Consorcio III. Este consorcio es el

seleccionado para llevar a cabo el tratamiento a escala semi-piloto en un reactor trifásico de lecho fluidizado en un estudio posterior.

#### Ensayo de biodegradación de los surfactantes presentes en el efluente simulado

Los agentes activos superficiales o surfactantes son moléculas que contienen un segmento liposoluble y otro hidrosoluble. De acuerdo a los estudio de Olmos *et al.* (2003) donde la solubilidad parcial tanto en agua como en aceite permite al surfactante ocupar la interface. En este estudio se utilizaron para la simulación del efluente, tres tensoactivos de tipo no iónico etoxilados (disp. A, disp. B y disp. 1), que mantienen soluble el índigo y por ende el agua coloreada. En este ensayo se quiso verificar si las cepas asimilaban como fuente de carbono los surfactantes presentes en el efluente tratado, para despejar la hipótesis de mecanismos de decoloración por parte de las bacterias. El resultado de este ensayo se presenta en la tabla 10. Donde puede observarse que todas las bacterias mostraron crecimiento en al menos un tipo de tensoactivo, lo que indica que pueden ser tomados como fuente de carbono y se corrobora la hipótesis de decoloración por desestabilización del complejo índigo-surfactantes, lo que causa la insolubilidad del índigo y posterior precipitación del colorante dando como resultado un efluente decolorado. Similar a lo reportado por Patoczka y Pulliam (1990), quienes mostraron la biodegradación de surfactantes etoxilados reflejado en la disminución de DQO y toxicidad del efluente después del tratamiento.

#### Evaluación de material de soporte

Los experimentos con el material de soporte (vidrio residual y plástico de baja densidad) fueron llevados a

**Tabla 5.** Absorbancia a 620nm para evaluar degradación de índigo.

Tiempo de degradación	Cepa					
Fecha/tiempo a la medida	1	2	3	4	5	
A 09/09(7 semanas)	0,314	0,197	0,216	0,193	0,300	0,293
B 29/09 (4 semanas)	0,263	0,218	0,185	0,157	0,140	0,239
C 13/10(2 semanas)	0,094	0,146	0,089	0,173	0,341	0,236

**Tabla 6.** Absorbancia a 650nm para evaluar crecimiento bacteriano.

Tiempo de degradación	Cepa					
	1	2	3	4	5	F
A	0,388	0,253	0,261	0,240	0,376	0,371
B	0,330	0,268	0,229	0,192	0,171	0,296
C	0,113	0,179	0,111	0,209	0,421	0,289

cabo con una mezcla de bacterias aisladas a partir del efluente textil. El vidrio residual exhibió una clara inhibición de crecimiento bacteriano, el plástico de baja densidad de mayor tamaño y porosidad fue comparado al tiempo  $t = 1$  día con el plástico reciclado de colores y presentó un menor crecimiento (figuras 1, 2 y 3).

Los experimentos con el material de soporte antracita fueron llevados a cabo con la mezcla de las seis cepas determinadas a partir del efluente textil. En la figura 4 se muestra el crecimiento alrededor del soporte de inmovilización después de 3 días de ser colocado sobre medio LB sólido, lo que indica que este tipo de material no inhibe el crecimiento bacteriano y puede ser exitosamente utilizado en el reactor trifásico de lecho fluidizado para un posterior tratamiento.

## Conclusiones

### Aislamiento

Se obtuvieron seis cepas bacterianas con capacidad de consumo de índigo como fuente única de carbono y energía, con potencial degradativo útil en el tratamiento biológico.

Para este estudio, los parámetros de cultivo que favorecen el crecimiento microbiano, a escala de laboratorio fueron: pH 7, una agitación de 130 rpm y una temperatura óptima de crecimiento dentro de un rango de 25-30 °C.

### Consorcio

En este estudio se llevó a cabo la decoloración de un efluente industrial simulado de la industria textil el cual está principalmente compuesto por índigo (C.I.Vat Blue 1), ditionito de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) y tres surfactante no iónicos.

La actividad metabólica del consorcio III, conformado por cuatro cepas bacterianas, arrojó como resultado un aumento de la eficiencia de decoloración del tinte índigo en comparación con la presentada por las distintas cepas en cultivos axénicos.

Se ensayó mineralizar el colorante con el objetivo de remover el color del efluente, sin embargo el estudio mostró que el proceso de decoloración puede darse principalmente por la desestabilización del complejo surfactantes-índigo generada por la acción bacteriana sobre los surfactantes. Lo que añade interés sobre el consorcio desarrollado, ya que potencialmente puede actuar sobre surfactantes presentes en aguas residuales industriales textiles. Por otra parte, se alcanzó el objetivo del estudio ya que a temperaturas en un rango de 25 – 30°C, agitación en un rango de 120 – 130 rpm y pH entre 7.0 – 7.5 se alcanzó el 76 % de remoción de color utilizando el consorcio desarrollado. Una decoloración significativamente alta, lo que indica

la aplicabilidad de este método para el tratamiento de aguas residuales textiles.

## Material de soporte

De los cuatro materiales de soporte evaluados, se llega a la elección de la antracita como material de soporte de inmovilización, debido a que no presentó inhibición en el crecimiento bacteriano, lo que permitiría su utilización como medio de soporte en un proceso de tratamiento empleando un biorreactor trifásico de lecho fluidizado.

## Agradecimientos

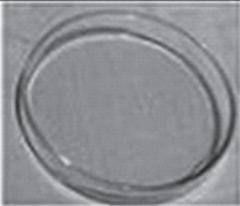
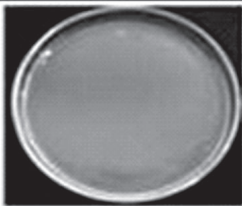
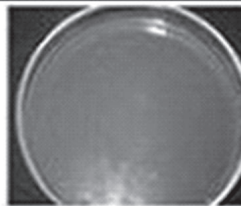
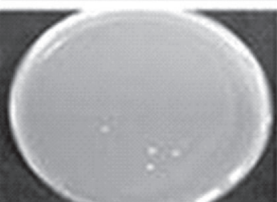
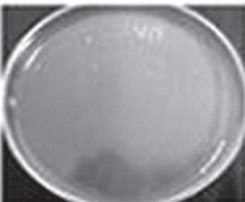
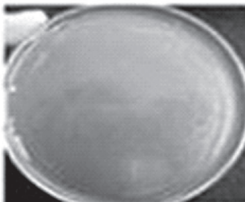
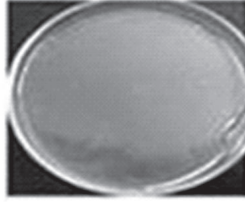
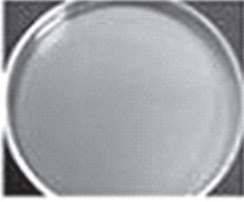
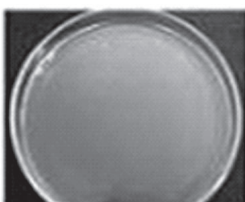
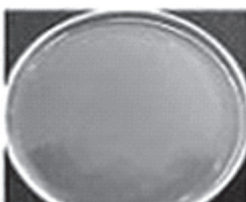
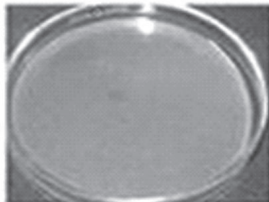
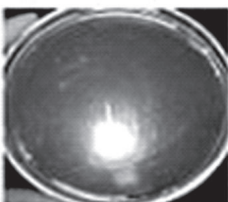
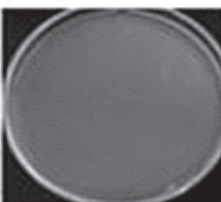
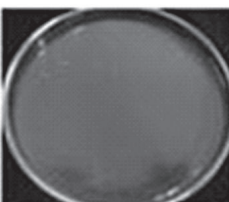
Este trabajo fue financiado a través de los proyectos de investigación: “Identificación y preparación de consorcio microbiano nativo con actividad catalítica para decoloración de índigo en agua residual industrial textil a través de una matriz de inmovilización” (Convocatoria DIME pregrado, código QUIPU 20201007812) y “Evaluación del tratamiento biológico para remoción de color índigo de agua residual industrial textil por un consorcio microbiano en lecho fluidizado” (Convocatoria DIME Bicentenario, código QUIPU 2020100773) de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

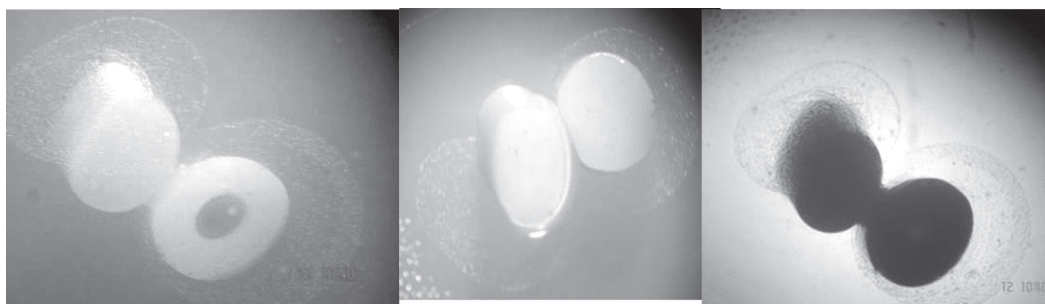
## Referencias bibliográficas

- Banat I.M., Nigam P., Singh D., Marchant R. 1996. Microbial decolorization of textile-dyecontaining effluents: A review. *Bioresour. Technol.* 58 (3): 217- 227.
- Chen K.C., Wu J.Y., Liou D.J., Hwang S.C.J. 2003. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. *Journal of Biotechnology*. 101(1): 57-68.
- Correia V.M., Stephenson T., Judd S.J. 1994. Characterization of textile wastewaters: A review. *Environmental technology*. 15(10): 917-929.
- Fischer-Colbrie G., Maier J., Robra K.H., Guebitz G.M. 2005. Degradation of the indigo carmine dye by an anaerobic mixed population. *Environmental Chemistry* (pp.289-294). Springer Berlin Heidelberg.
- Forgacs E., Cserhati T., Oros G. 2004. Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review. *Environment International*. 30(7): 953-971.
- Jadhav J.P., Kalyani D.C., Telke A.A., Phugare S.S., Govindwar S.P. 2010. Evaluation of the efficacy of a bacterial consortium for the removal of color, reduction of heavy metals, and toxicity from textile dye effluent. *Bioresour. Technol.* 101(1):165-173.
- Kaushik P., Malik A. 2009. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. *Environment International*. 35(1): 127-141.
- Khehra M.S., Saini H.S., Sharma D.K., Chadha B.S., Chimni S.S. 2005. Decolorization of various azo dyes by bacterial consortium. *Dyes and Pigments*. 67(1): 55-61.
- Khehra M.S., Saini H.S., Sharma D.K., Chadha B.S., Chimni S.S. 2005. Comparative studies on potential of consortium and constituent pure bacterial isolates to decolorize azo dyes. *Water Research*. 39(20): 5135-5141.
- Khelifi E., Gannoun H., Touhami Y., Bouallagui H., Hamdi M. 2008. Aerobic decolourization of the indigo dye-containing textile wastewater using continuous combined bioreactors. *Journal of Hazardous Materials*. 152(2): 683-689.

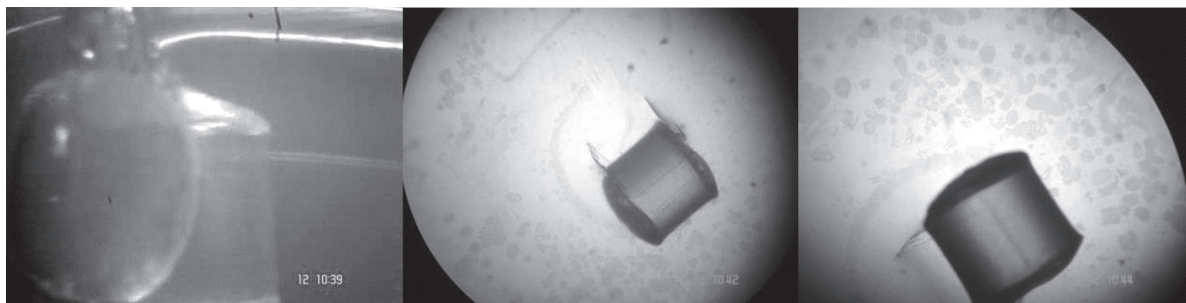


Tabla 10. Crecimiento sobre los surfactantes

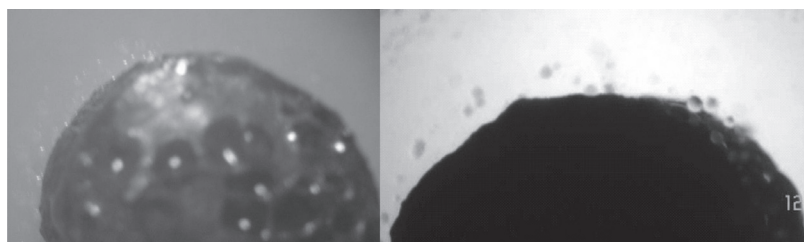
Cepas	Disp. A	Disp. B	Disp. 1	Mezcla
C1	<p>-</p> <p>Esta cepa no presentó crecimiento sobre el medio evaluado.</p>	<p>+</p> 	<p>+</p> 	<p>+</p> 
C2	<p>-</p> <p>Esta cepa no presentó crecimiento sobre el medio evaluado.</p>	<p>-</p> <p>Esta cepa no presentó crecimiento sobre el medio evaluado.</p>	<p>+</p> 	<p>-</p> <p>Esta cepa no presentó crecimiento sobre el medio evaluado.</p>
C3	<p>-</p> <p>Esta cepa no presentó crecimiento sobre el medio evaluado.</p>	<p>+</p> 	<p>+</p> 	<p>+</p> <p>Esta cepa no presentó crecimiento sobre el medio evaluado.</p>
C4	<p>+</p> 	<p>+</p> 	<p>+</p> 	<p>+</p> 
C5	<p>+</p> 	<p>-</p> <p>Esta cepa no presentó crecimiento sobre el medio evaluado.</p>	<p>-</p> <p>Esta cepa no presentó crecimiento sobre el medio evaluado.</p>	<p>-</p> <p>Esta cepa no presentó crecimiento sobre el medio evaluado.</p>
C6	<p>+</p> 	<p>-</p> <p>Esta cepa no presentó crecimiento sobre el medio evaluado.</p>	<p>+</p> 	<p>+</p> 



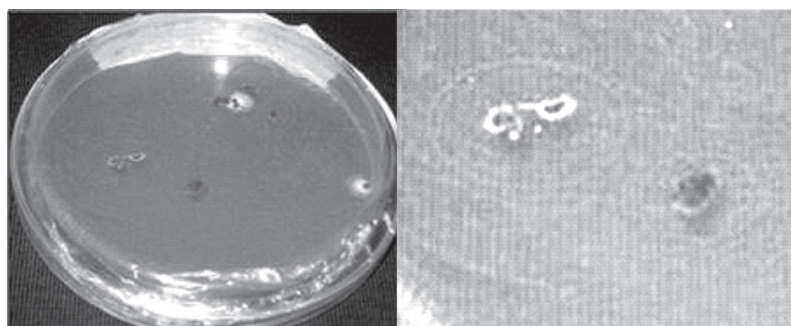
**Figura 1.** Plástico reciclado (de colores). Cultivo de 1 día. Se observa crecimiento alrededor del material.



**Figura 2.** Vidrio residual, poliestireno cristal de alta densidad (transparente), se observa halo de inhibición del crecimiento. Cultivo de 1 día. 2,3 Cultivo de 15 días.



**Figura 3.** Plástico reciclado (color negro, baja densidad y poroso) se observa escaso crecimiento. Cultivo de 1 día.



**Figura 4.** Antracita. Crecimiento bacteriano sobre y alrededor del soporte de inmovilización antracita. Nota: Se observa crecimiento alrededor del material.

Kuhad R.C., Sood N., Singh T., Ward O.P. 2004. Development in microbial methods for the treatment of dye effluents. *Advances in Applied Microbiology*. 56: 185-213.

Ministerio del Medio Ambiente. 2002. *Guía Ambiental "Formulación de planes de pretratamiento de efluentes industriales"*. Bogotá, Colombia. Consultado en [http://www.minambiente.gov.co/documentos/Efluentes\\_industriales.pdf](http://www.minambiente.gov.co/documentos/Efluentes_industriales.pdf) y en [http://www.minambiente.gov.co/documentos/Efluentes\\_industriales\\_parte\\_2.pdf](http://www.minambiente.gov.co/documentos/Efluentes_industriales_parte_2.pdf)

Moosvi S., Kher X., Madamwar D. 2006. Isolation, characterization and decolorization of textile dyes by a mixed bacterial consortium JW-2. *Dyes and Pigments*. 74(3):723 -729.

- Olmos R.R., Sepulveda R.M., Villalobos F.M. 2003. Agua en el ambiente: muestreo y análisis. Baja California, México. Ed. Plaza y Valdés S.A.
- Patoczka J., Pulliam W.G. 1990. Biodegradation and secondary effluent toxicity of ethoxylated surfactants. *Water Research*. 24(8): 965-972.
- Pearce C.I., Lloyd J.R., Guthrie, J. T. 2003. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes and Pigments*. 58(3): 179-196.
- Prideaux V. 2003. *Handbook of Indigo Dyeing*. Search Press Limited. Kent: United Kingdom.
- Prigione V., Tigini V., Pezzella C., Anastasi A., Sannia G., Varese G.C. 2008. Decolourisation and detoxification of textile effluents by fungal biosorption. *Water Research*. 42(12): 2911-2920.
- Robinson T., McMullan G., Marchant R., Nigam P. 2001. Remediation of dyes in textile effluent: A critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*. 77(3): 247-255.
- Robinson T., Chandran B., Naidu G.S., Nigam P. 2002. Studies on the removal of dyes from a synthetic textile effluent using barley husk in static-batch mode and in a continuous flow, packed-bed, reactor. *Bioresource Technology*. 85(1): 43 – 49.
- Shaw C.B., Carliell C.M., Wheatley A.D. 2002. Anaerobic/aerobic treatment of coloured textile effluents using sequencing batch reactors. *Water Research*. 36(8):1993-2001.
- Tony B. D., Goyal D., Khanna S. 2009. Decolorization of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 63(4):462 – 469.

# Rol biológico y aplicaciones de los miRNAs en cáncer de seno

## Biological role and applications of miRNAs in breast cancer

Yeimy Viviana Ariza Márquez\*, Ángela Patricia Beltrán López\*\*,  
Ignacio Briceño Balcázar\*\*\*, Fabio Ancízar Aristizábal\*\*\*\*

### Resumen

Los miRNAs son pequeños RNAs que participan en diversos procesos de regulación génica, mediante ribointerferencia y juegan un papel clave en diversos procesos biológicos, tales como proliferación celular, diferenciación y apoptosis. En consecuencia, la expresión alterada de miRNAs contribuye a la enfermedad humana, incluyendo cáncer. En esta revisión, nos centraremos en los recientes hallazgos de miRNAs que inciden en el desarrollo de cáncer y particularmente en cáncer de seno, simultáneamente evaluaremos sus mecanismos de regulación, su clasificación, su uso como marcadores de invasión tumoral, de sensibilidad a fármacos y adicionalmente exploraremos la utilidad de los miRNAs en el diagnóstico, seguimiento y tratamiento individualizado. Finalmente encontramos que los miRNAs representan una gran alternativa para entender las bases moleculares de los procesos tumorales implícitos en cáncer de seno y una vez se conozcan todas sus dianas, será posible dilucidar al menos en parte este proceso complejo y multigénico, ayudado mediante herramientas como la generación de bases de datos, para reportar la expresión diferencial de miRNAs, elementos que nos permitirá realizar medicina preventiva y mejorar la calidad de vida de los pacientes y sus familias.

**Palabras clave:** cáncer de seno, miRNAs, anti-oncomir, oncomir, regulación post-transcripcional, RNAm.

### Abstract

MiRNAs are small RNAs that are involved in various processes of gene regulation by RNAi and play a key role in various biological, such as cell proliferation, differentiation and apoptosis processes. Consequently, the altered expression of miRNAs contribute to human disease, including cancer. In this review, we will focus on the recent findings of miRNAs that affect the development of cancer, particularly breast cancer, simultaneously evaluate their regulatory mechanisms, their classification, their use as markers of tumor invasion, drug susceptibility and further explore the utility of miRNAs in the diagnosis, monitoring and individualize treatment. Finally found that miRNAs represent a great alternative for understanding the molecular basis of implicit tumor processes in breast cancer and once all targets are known, it will be possible to elucidate at least in part this complex and multigenic process, aided by tools such as generation of databases, to report the differential expression of miRNAs, elements that allow us to preventive medicine and improve the quality of life of patients and their families.

**Key words:** breast cancer, miRNAs, anti-oncomir, Oncomir, post-transcriptional regulation, RNAm.

**Recibido:** abril 24 de 2013

**Aprobado:** abril 4 de 2014

### Introducción

En octubre de 2001 tres publicaciones de la revista "Science", indicaron el rol de pequeños ncRNAs o sRNAs (non coding o small RNAs, RNAs no codificantes o pequeños, por sus siglas en inglés) en el desarrollo del nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Lagos-Quintana

et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee y Ambros 2001). Posteriormente el Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 2006 fue concedido a Andrew Fire y Craig Mello por su descubrimiento de los RNAs de interferencia (RNAi) dentro de los que identificaron los siRNAs, (*small interfering RNA*, en español ARN pequeño de interferencia o ARN de silenciamiento), los micro

\* Bacterióloga y laboratorista clínica UCMC, cPhD biotecnología Universidad Nacional de Colombia, yvarizam@unal.edu.co

\*\* Bacterióloga y laboratorista clínica UCMC, cPhD biotecnología Universidad Nacional de Colombia, apbeltranl@unal.edu.co

\*\*\* Profesor titular Universidad de la Sabana y profesor Pontificia Universidad Javeriana, ibriceno@javeriana.edu.co

\*\*\*\* Director Instituto de Biotecnología de Universidad Nacional de Colombia, faaristizabal@unal.edu.co



ARN (miARN o miRNA por sus siglas en inglés), y los ARNs asociados a Piwi (Piwi-ARNs o piRNAs por sus siglas en inglés), de los tres se identificó que su mecanismo de acción es el silenciamiento génico mediado por RNAs de cadena sencilla, que siendo complementarios a un RNA mensajero (RNAm), conducen habitualmente a la degradación de éste último. En esta revisión exploraremos la biogénesis, características y dianas terapéuticas de los miRNAs, enfatizando en cáncer de seno.

Los miRNAs son moléculas claves en la regulación de diversos procesos celulares dentro de los que es posible citar; proliferación, diferenciación, movilidad, invasión, muerte celular, entre otras, (Li *et al.*, 2010) debido a esto, se ha generado un interés particular en la investigación del rol que pueden desempeñar en cáncer. Junto a esto se han identificado como un mecanismo clave del control post-transcripcional dentro de las redes de regulación génica. En consecuencia ellos surgen como importantes mediadores en la tumorigénesis, dando lugar a un cambio de paradigma en oncología donde se busca identificar posibles dianas para encaminarnos hacia una medicina personalizada, donde el uso de microarrays de miRNA ha permitido la identificación de un gran número de miRNAs, como biomarcadores para cáncer. En esta vía es interesante reconocer que los miRNAs tienen una estabilidad notable, en tejido embebido en parafina y muestras de sangre con lo cual se perfilan como marcadores tumorales para ser usados en medicina personalizada.

Múltiples estudios han evidenciado que la expresión anormal de uno o más miRNAs, está asociado con la patogénesis de enfermedades humanas incluyendo tumores sólidos y hematopoyéticos. (Calin y Croce 2006). El patrón de expresión de los miRNAs y perfil global de expresión de miRNAs es conocido como "miRNoma" (Yong y Anindya 2009), y a partir de este, se ha identificado que ciertos miRNAs pueden actuar como oncogenes, genes supresores de tumor, incidir en procesos metastásicos e incluso pueden actuar como moduladores de células madre. En presencia de una regulación negativa de los miRNAs se les ha encontrado actividad como supresores de tumor, en contraste la acumulación de subconjuntos de estos, los involucra en funciones como oncogenes. Lo cual ha sido evidenciado en diferentes estudios, como por ejemplo la baja regulación de let-7 en cáncer de pulmón (Takamizawa *et al.*, 2004), eliminación de miR-15 y miR-16 en leucemia linfocítica crónica (LLC) (Cimmino *et al.*, 2005), y el hallazgo de miR-17-5p y miR-20a en el control de la muerte celular y proliferación (O'Donnell *et al.*, 2005; Croce CM 2009; Shimono *et al.*, 2009). De igual modo se ha reportado regulación transcripcional o epigenética de miRNAs en cáncer (Lujambio *et al.*, 2007; Saito *et al.*, 2006). En las investigaciones actuales no sólo se identifican miRNA como biomarcadores, sino que adicionalmente se determina el gen que tienen como diana y los mecanismos sub-

yacentes que pueden estar involucrados. El rápido descubrimiento de muchos de los blancos de los miRNA y sus vías, ha contribuido al desarrollo de productos terapéuticos basados en miRNA, pero los avances en el desarrollo de fármacos a partir de secuencias antisentido o siRNA se ha visto obstaculizado por la estabilidad, la especificidad y los problemas de entrega al RNAm diana.

En la última década, el número de genes humanos que se sabe son regulados por miRNAs ha aumentado rápidamente (He y Hannon 2004; Chen C. Z., 2005), esto mediante un número creciente de estudios que han demostrado que la expresión de miRNAs se correlaciona con patrones diferenciales que se ven afectados por el tejido implicado y grado de especialización, del mismo modo se ha determinado que existe un patrón de expresión diferencial entre los diversos tipos de cáncer mediante estudios de cohortes que incluyen casos y controles. (Lu *et al.*, 2005). Hasta la fecha más de 24.521 miRNAs precursores han sido registrados en miRBase (Versión miRBase 20) y se prevé que el 30% de estos miRNAs, regulan genes codificantes de proteínas en el genoma humano (Kent y Mendell 2006).

En cáncer de seno se ha establecido que existen patrones de expresión de miRNAs asociados al fenotipo de los diferentes subtipos de cáncer, donde el análisis de los patrones de expresión de miRNA ha llevado a la identificación de firmas que pueden diferenciarse del tumor de los tejidos normales (Lorio *et al.*, 2005 y Blenkiron *et al.*, 2007). Análisis de RNAm objetivo de miRNAs con expresión diferencial en los tejidos normales y tumorales de seno, indica que su expresión aberrante impacta la regulación de las redes celulares importantes conocidas para conducir a cáncer de seno (O'Day E, Lal A 2010). Esto se sustenta en la observación de que varias características de tumor de seno clínicamente relevantes, como el tamaño del tumor, la afectación ganglionar, invasión vascular, los receptores hormonales y el estado de HER2, también están relacionados con la expresión de microRNAs particulares (Lorio *et al.*, 2005 ; Blenkiron *et al.*, 2007 y Lowery *et al.*, 2009]. Además, los microARNs podrían ser utilizados como marcadores de la potencial metastático de los tumores primarios de seno. (Tavazoie *et al.*, 2008).

El cáncer de seno es una enfermedad genética de fenotipo complejo, que representa a nivel mundial el cáncer más común en mujeres (Veronesi *et al.*, 2005; Alvarez RH. 2010) no obstante actualmente se cuenta con herramientas que garantizan un mejor pronóstico debido a los avances en el diagnóstico, mediante el examen clínico de la glándula, el autoexamen, la mamografía, en la misma línea el manejo de las pacientes en el tratamiento mediante radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia, acompañado del estudio de la enfermedad para el entendimiento de las bases genéticas de esta, con el fin de generar una medicina

personalizada, donde se evalué en cada paciente su carga genética y susceptibilidad asociada, además factores que puedan desencadenar riesgo a presentar la enfermedad están permitiendo mejorar el pronóstico en dichas pacientes e incidir en el mejoramiento de la calidad de vida de las mismas.

Esta revisión recopila las publicaciones científicas originales más importantes emitidas a la fecha, que reportan la participación de miRNAs en cáncer, centrándose en su incidencia en cáncer de seno, explorando su potencial como blancos terapéuticos y retos futuros.

## Definición de microRNA

miRNAs son una clase de RNAs no codificantes que participan en la regulación de la expresión génica. Los miRNAs son fragmentos cortos de RNA, de 19 a 25 nucleótidos que se unen al RNAm objetivo donde inhiben su traducción o causan la degradación de este (Bentwich *et al.*, 2005). De acuerdo a la base de datos de secuencias miRBase (publicada en junio de 2013, versión 20) más de 24.521 miRNAs precursores han sido registrados, de los cuales 30424 son productos maduros de miRNAs, de 206 especies. Se prevé que el 30% de estos miRNAs, regulan genes codificantes de proteínas en el genoma humano. (Kent y Mendell 2006). A pesar de este gran número de miRNAs identificados, el RNAm destino y la función biológica se ha atribuido a sólo unos de ellos. Con estos lineamientos ha sido claramente demostrado que algunos miRNAs, influyen en el desarrollo y progreso de cáncer (Calin y Croce 2006). Por lo tanto, la identificación de la expresión diferencial de miRNAs, estableciendo sus funciones asociadas con cáncer y el desarrollo de formas para modular sus actividades pueden producir poderosas estrategias terapéuticas contra el cáncer.

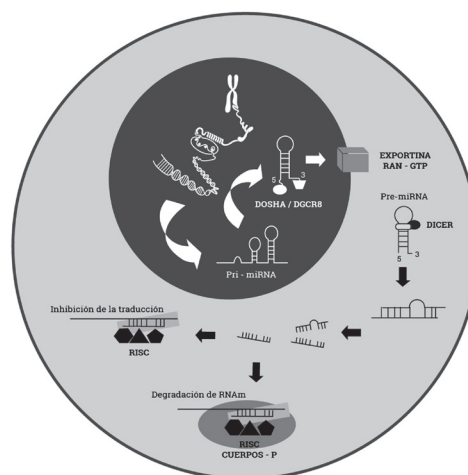
Los miRNAs son secuencialmente transformados en moléculas precursoras que son codificadas por genes miRNA (Bartel DP 2004) (figura 1). Los genes que generan los miRNA están conservados evolutivamente y pueden estar situadas dentro de intrones o exones de genes que codifican proteínas (70%) o en áreas intergénicas (30%) (Rodríguez *et al.*, 2004). La mayor parte de los miRNAs intrónicos o exónicos se orientan en paralelo con su gen anfitrión, lo que sugiere que se transcribe de forma simultánea, mientras que el grupo restante de miRNAs se transcribe de las regiones intergénicas o de genes que componen unidades independientes de transcripción (Rodríguez *et al.*, 2004).

Los genes miRNA se denominan con el mismo nombre (*mir*) escrito en cursiva para distinguirlos de los miRNA correspondientes al producto maduro (denominado miR) seguido de un número, por ejemplo, miR-1, los miRNAs de similares secuencia se distinguen por una letra adicional (a, b, c...) seguido del número del miRNA (por ejemplo, miR-125b). Un miRNA de secuencia madura idéntica puede aparecer en varios loci del genoma con secuencias de diferentes precursores. En

este caso, los genes miRNA diferentes se distinguen por la adición de otro número (1, 2, 3...) al final (por ejemplo miR-125b-1).

## Biogénesis de los microRNAs

Los miRNAs son procesados a partir de un transcrito de alrededor de 70 a 90 nucleótidos, el cual tiene una estructura de "hairpin", "hairpin loop" o "Stem-loops" (Hutvanger y Zamore 2002) por la acción de la RNA polimerasa II. Los Stem-loops son RNA de cadena sencilla, con una secuencia de nucleótidos que se pliegan sobre sí mismos para formar una doble hélice con una región en la secuencia que presenta complementariedad imperfecta, formando un lazo abierto en uno los extremos, con un casquete (7-metilguanosina) en el extremo 5' y una cola poli (A) en el extremo 3'. Los transcritos primarios que contienen una sola estructura Stem-loops se les denominan monocistrónicos y aquellos que poseen más de un hairpin se les conocen como policistrónico. Sin embargo, otras vías pueden generar un conjunto menor de miRNAs, en especial de repeticiones genómicas, por ejemplo, la RNA polimerasa III que es responsable de la transcripción de miRNAs en las repeticiones Alu. (Borchert *et al.*, 2009). Tras la síntesis, del pri-miRNA este se transforma inicialmente en el interior del núcleo por la RNasa II (Drosha) y el DGCR8 (proteína de unión a RNA de cadena doble, región crítica DiGeorge) donde se da paso al precursor miRNA (pre-miRNA) de ~ 70 nucleótidos figura 2a. (Lee *et al.*, 2003). Pri-miRNA es transportado al citoplasma por el factor de exportación nuclear (Ex-



**Figura 1.** Biogénesis de miRNAs. En la figura se muestra como, a partir de la información genética contenida en el ADN, se genera un pri-miRNA, que es reconocido por las proteínas DROSHA/DGCR8, las cuales generan un pre-miRNA que al estar en el citoplasma es reconocido por DICER, que genera un dúplex sin bucle, donde posteriormente solo quedara una hebra que se encargará de guiar el RNAm a la inhibición de su expresión o lo llevara a ser degradado a los cuerpos P.

portin-5/Ran-GTP), donde se procesa a través de una serie de cortes por la endonucleasa RNasa III, Dicer TRBP / y Ago2 para generar un dúplex miRNA maduro de 17-25 pb, figura 2b.(Bentwich I, 2005). El duplex miRNA es procesado por la helicasa A quedando un miRNA de cadena simple llamada hebra guía y degradándose la segunda hebra\*, luego la hebra guía entra al complejo RISC que dirige el proceso, produciendo el silenciamiento del RNAm diana. (Berezikov *et al.*, 2006). Es comúnmente aceptado que los miRNAs maduros regulan la expresión génica mediante la unión a la región 3' no traducida (3'-UTR) del RNAm diana, provocando la degradación del RNAm o la inhibición de su traducción. Figura 1, (Bentwich I 2005; Berezikov *et al.*, 2006; Bernstein *et al.*, 2001; Hutvagner *et al.*, 2001). El miRNA maduro es parcialmente complementario a uno o varios RNAm (Jackson *et al.*, 2007; Pillai *et al.*, 2007), la especificidad, en la elección de destino de los miRNAs, se define principalmente por la complementariedad de la secuencia entre los sitios de destino del RNAm y la secuencia de nucleótidos de la posición 2-8 en el extremo 5' del miRNA, conocido como " Región seed" (Bernstein *et al.*, 2001; Brennecke *et al.*, 2005).

En eucariotas la degradación del RNAm puede ocurrir mediante dos vías, donde cada una de ellas es iniciada por un acortamiento gradual de la cola poli A del RNAm. En el primer caso, la secuencia del RNAm puede ser degradado en sentido 3' - 5' por una progresiva descomposición, por exosoma, o en el segundo caso por extracción de la caperuza seguido por la degradación de la hebra en sentido 5' - 3', catalizada por la exonucleasa XRN1 (Filipowicz *et al.*, 2008). Los niveles de RNAm son controlados por ribonucleoproteínas (RNPm) a través del reclutamiento de los componentes de la maquinaria de degradación, lo que lleva a la deadenilación y pérdida de la caperuza del RNAm. En lo que concierne a la degradación o por lo menos sus pasos finales, se cree que ocurre en las estructuras celulares llamadas cuerpos-P, estructuras que poseen enzimas catabólicas del RNAm (GW182 y RCK/p54) y represores trasduccionales.

Los niveles de proteína del gen objetivo, por consiguiente, se pueden ver reducidos, mientras que los niveles de RNAm pueden o no estar disminuidos. En los seres humanos, principalmente los miRNAs inhiben la traducción de proteínas de los genes objetivos y sólo con poca frecuencia causa la degradación o la división del RNAm (Bartel D P. 2004). Teniendo en cuenta que el cáncer es en última instancia, una consecuencia de la expresión génica desordenada, se puede inferir que los miRNAs contribuyen al desarrollo del cáncer (Caldas *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2005).

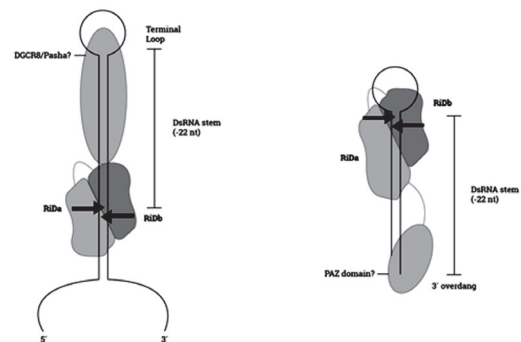
### Mecanismos de silenciamiento y regulación de los miRNAs

Los miRNAs se suelen unir a la región 3' UTR del transcrito, donde inician la degradación del mRNA o

inhiben la traducción. El silenciamiento mediado por miRNAs se lleva a cabo mediante inhibición de la traducción o por degradación dependiente del grado de complementariedad entre el miRNA y la región 3'UTR del transcrito.

Mediante los enfoques de la bioinformática, diversos programas como miRanda, Pictar, Targetscan, Tarbase entre otros, puede predecir miles de genes que son potencialmente regulados por miRNAs (Shirdel *et al.*, 2011) basados en la complementariedad de secuencias, si bien existe un gran número de falso positivos actualmente se está investigando para reducirlos mediante el refinamiento de dichas herramientas, y en base en estas, también se han generado base de datos robustas que contienen esta información y están a disposición de los investigadores para ser consultadas como miRbase, MirWalk, microRNA.org, miRDB, mir2disease.org y miRTarBase. Los mecanismos subyacentes de por qué y cómo se liberan los miRNAs en gran medida son desconocidos aunque por otra parte los mecanismos que los pueden modificar se han logrado dilucidar y se muestran en la figura 3.

La pérdida de la función de un miRNA es debido a varios mecanismos, incluyendo la eliminación genómica, mutaciones, silenciamiento epigenético, y/o alteraciones en el procesamiento del miRNA (Calin *et al.*, 2002; Calin *et al.*, 2005; Saito *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2007). Como muestra de ello, dos estudios proporcionaron información acerca de los mecanismos de regulación de miRNAs donde establecieron que la interrupción de la interacción de un solo miRNA y su RNAm objetivo puede producir un fenotipo anormal en células de mamífero. Además, existe evidencia que los miRNAs están regulados indirectamente a través del control de sus enzimas de procesamiento. (Mayr *et al.*, 2007; Lee y Dutta 2007),



**Figura 2.** Procesamiento de Primario y Pre-miRNA, en la figura de la izquierda se encuentra un primario miRNA sobre el cual se señala el punto donde las proteínas DGRB en eucariotas y Pasha en procariotas reconoce el hairpin loop y realiza el corte para la generación de un pre-miRNA que es en detalle el esquema que se encuentra a la derecha sobre el cual se señala los puntos donde realiza el reconocimiento la proteína Dicer. Tomado de Kim N. V. 2005.

De modo similar Thomson *et al.*, 2006 demostraron que una regulación negativa de miRNAs en el cáncer humano no se asocia con una reducción de los niveles de los transcritos primarios de miRNA. Los autores en tanto, sugieren que la regulación de miRNAs puede estar dada en posteriores pasos de procesamiento figura 3, por ejemplo, a través de la función alterada de la enzima Drosha (Thomson *et al.*, 2006).

En este mismo sentido la transcripción de un gen miRNA, el mir-124a, ha demostrado ser inactivado por hipermetilación de su promotor en diferentes tumores humanos. Este proceso de silenciamiento epigenético es un mecanismo conocido para inactivar genes codificantes de proteínas en células de cáncer y puede aplicarse de modo similar a los miRNAs. De modo similar el gen miRNA mir-127 se expresa en las células normales, pero no en las células con cáncer, Saito y colaboradores en 2006, demostraron que miR-127 está presente en cultivos de células de cáncer humano, después del tratamiento con drogas desmetilantes, lo que sugiere que está sujeto a

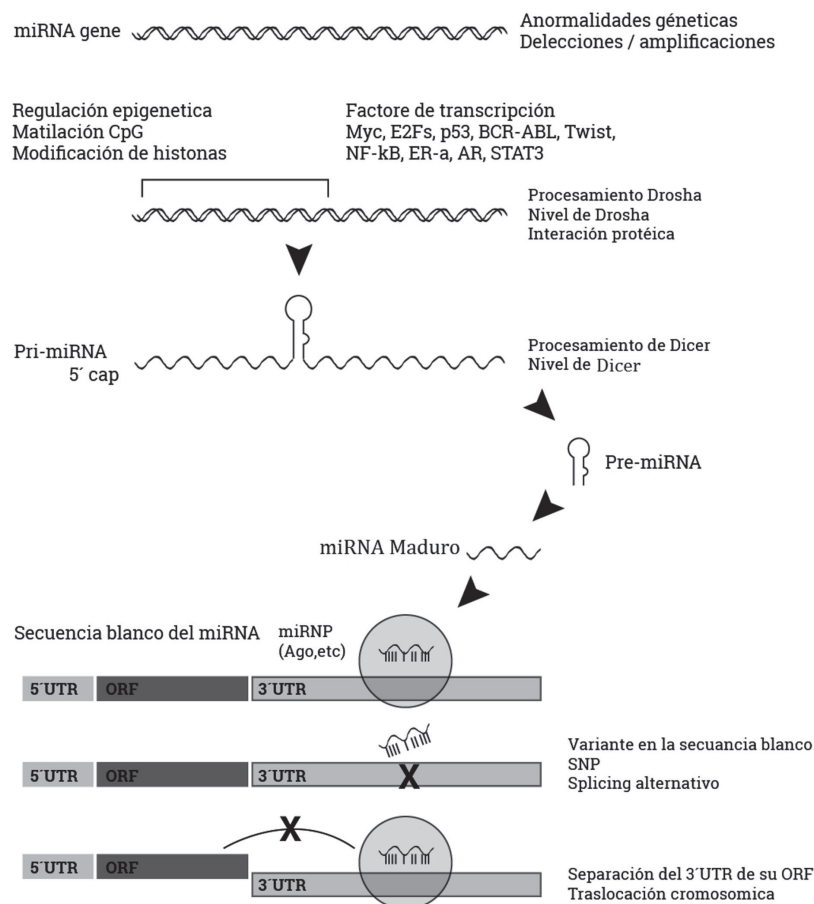
silenciamiento epigenético por hipermetilación del promotor.

En la tabla 1 se resumen la expresión diferencial de miRNAs en cáncer de seno, centrándose en el potencial de miRNAs, como biomarcadores para el diagnóstico, tratamiento y apoyo en la búsqueda de nuevos blancos.

Dependiendo del efecto que generen los miRNAs en el gen diana, se les ha asignado una clasificación y denominación:

### MicroRNAs oncogénicos (oncomirs)

Los “oncomirs” son miRNAs que promueven el desarrollo de tumores, regulando e inhibiendo genes supresores de tumor / o controlando los genes que intervienen en la diferenciación celular o apoptosis. Los oncomirs están significativamente sobre expresados en varios tumores debido a mecanismos epigenéticos o desregulación a nivel transcripcional figura 3 (Brennecke *et al.*, 2005; Cho WC.2007).



**Figura 3.** Mecanismos de regulación de los miRNAs, se indican los diferentes mecanismos que pueden alterar la acción de un miRNA. Tomado de Yong *et al.*, 2009.



Dentro de los miRNAs identificados como oncomirs se encuentra el miR-21 que está involucrado en varios procesos relacionados con cáncer, como invasión y migración. Varios grupos han observado la sobre expresión de miR-21 en tumores de seno en comparación con tejidos sanos (Yang *et al.*, 2004; Sempere *et al.*, 2007; Si *et al.*, 2007; Frankel *et al.*, 2008). Al suprimir la expresión endógena de miR-21 en células de cáncer de seno, se observó un aumento en la expresión de 58 proteínas, lo que implica que podrían ser blancos potenciales de miR-21. La validación de 12 de estos objetivos candidatos fueron realizados mediante ensayos de luciferasa, donde mostraron que seis de ellos eran blancos directos de miR-21. En general, los resultados demuestran que el miR-21 afecta la expresión de muchos de sus objetivos a través de inhibición de la traducción y pone de manifiesto la utilidad de la proteómica para la identificación de los objetivos de miRNA. (Yang *et al.*, 2009). En la evaluación genómica de las células MCF-7 y los potenciales blancos del miR-21 se identificaron algunos RNAm reguladores de p53, en los que se incluyen FAM3C, ACTA2, APAF1, BTG2, FAS, CDKN1A (p21), PDCD4 y SESN1, sugiriendo un vínculo funcional entre el miR-21 y la vía supresora de tumor de p53 (Frankel *et al.*, 2008; Hui *et al.*, 2009). La generación de MCF-7 knock down de miR-21 inhibe el crecimiento de células *in vitro* y suprime el xenoinjerto en modelo murino con células MCF-7. (Frankel *et al.*, 2008). Adicionalmente el supresor de tumor tropomiosina 1 (TPM1) fue identificado como otro de los objetivos de miR-21 en células MCF-7.

Por otra parte, miR-27a fue reportado en cáncer de seno como un oncomiR que regula el gen ZBTB10 (zinc finger and BTB domain containing 10), un represor de proteínas específicas oncogénicas (Sp). La inactivación de miR-27a en células MDA-MB-231 induce expresión de ZBTB10 y disminuye la expresión de los genes Sp. miR-27a suprimió la expresión de cdc2/ciclina B inhibidor de Myt-1 en células MDA-MB-231, lo que aumenta la actividad de la cdc2/ciclina B e induce la proliferación de células de cáncer de seno. De este

modo es evidente que los miRNAs regulan distintas cascadas de señalización en células de cáncer de seno.

### MicroRNAs Supresores de tumor (Anti-oncomirs)

Los miRNAs pueden inhibir la tumorigénesis por represión de oncogenes. Lo cual se ha evidenciado al estudiar la interacción de miRNA con proteínas de la familia ErbB. La familia ErbB juega un papel importante en el desarrollo de organismos, proliferación celular y supervivencia de tumores epiteliales humanos. (Yarden y Sliwkowski 2001) Scott y colaboradores en el 2007 encontraron que ErbB2 está sobre expresado en cerca del 20-30% de cáncer de seno humano y se identificó al miR-125a como el regulador de este, en células de cáncer de seno. Adicionalmente, miR-125a y miR-125b están sobre expresados en células SKBR3, produciendo disminución de la proteína ErbB2 en un 40% a 65% y la disminución de ErbB3 entre el 60% a 80%. En las células SKBR3 que sobre expresan el miR-125a o miR-125b se altera su crecimiento dependiente de anclaje, migración, y las capacidades para invadir. (Scott *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009).

Hay varios miRNAs que se consideran como supresores de tumor, a saber, se han identificado let-7, miR-17-5p, miR-29, miR-34 y miR-127 (Zhang *et al.*, 2007; Takamizawa *et al.*, 2004). De hecho, los primeros miRNAs identificados como asociados a tumor (miR-15 y miR-16) son de esta clase (Calin *et al.*, 2002), y ahora experimentalmente se ha demostrado su actividad como anti-oncogénicos (Calin *et al.*, 2008). Además, el gen supresor de tumor *BRCA1* (Breast Cáncer1) también ha sido identificado como un blanco de miR-15a y miR-16 (Zhu *et al.*, 2009).

La localización genómica del clúster de miR-17/20, está en el cromosoma 13q31 y está asociado con pérdida de heterocigosidad en diferentes tipos de cáncer, incluyendo cáncer de seno. El miR-17/20 reprime la expresión de la ciclina D1, suprime la proliferación de células MCF-7 e inhibe la transición de la fase G1/S en el ciclo celular. (Yu *et al.*, 2008). En líneas de cáncer

**Tabla 1.** Expresión de miRNAs en cáncer de seno, indicando aquellos que se encuentran sobre-expresados y los que están sub expresados.

miRNAs sobre- expresados	miRNAs sub expresados
<p>mir-21 mir-122a mir-128b mir-136 mir-149 mir-155 mir-191 mir-202 mir-206 mir-210 mir-213 (Lorio <i>et al.</i>, 2005).</p> <p>mir-29b mir-29c mir-98 mir-181b mir-181d mir-365 (Yan <i>et al.</i>, 2008).</p>	<p>mir-let7a , miR-205(Sempere <i>et al.</i>,2007). mir- let7d mir-10b , mir-125b-1 mir-143 mir- 145 mir-204 ( Lorio <i>et al.</i>, 2005). mir-31 miR-355 miR-497 (Yan <i>et al.</i>, 2008). mir-125b-2 (Mattie <i>et al.</i>, 2006). miR-206(Kondo <i>et al.</i>,2008).</p>

de seno, la disminución de la expresión de miR17/20 esta inversamente correlacionada con la alta expresión de la ciclina D1, en comparación con tejido normal de seno. La delección dirigida del clúster miR17/20 en modelo de ratón, ha mostrado que se genera la muerte poco después del nacimiento (Ventura *et al.*, 2008).

Los estrógenos, que se unen al receptor ER- $\alpha$ , son un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de seno. El ER- $\alpha$  está sobre expresado en aproximadamente 75% de los cánceres primarios de seno. Se informó que la expresión de miR-206 está fuertemente inhibida por agonistas de ER- $\alpha$ , y los niveles de miR-206 son más altos en células ER- $\alpha$  negativas de la línea MB-MDA-231 al ser contrastadas con las células MCF-7 ER- $\alpha$  positivas (Adam *et al.*, 2007; Kondo *et al.*, 2008). El miR-206 reduce la sobre-expresión del ER- $\alpha$  a nivel de las células MCF-7, lo que indica un circuito de retroalimentación entre la autorregulación de ER- $\alpha$  y miR-206. La disminución de la expresión de miR-206 se produce en tejido humano ER- $\alpha$  positivo, de cáncer de seno. El miR-206 y el nivel de expresión de proteínas ER- $\alpha$  están inversamente correlacionados con cáncer de seno.

De manera similar el miR-205 regula la expresión del receptor HER3, inhibiendo de este modo las señales de proliferación mediadas por HER (Lorio *et al.*, 2009)

Por otro lado, la evidencia ha mostrado que Ubc9 (enzima transportadora de ubiquitina- 9), y E2-conjugada (enzima de conjugación de ubiquitina 2) afectan el crecimiento celular y desarrollo de cáncer, adicionalmente se someten a la regulación post-transcripcional por miR-30e en el cáncer de seno. La expresión ectópica que suprimen el crecimiento en las células, por miR-30e puede ser parcialmente revertido por Ubc9 (Wu *et al.*, 2009).

De modo similar se ha encontrado que la sobreexpresión de miR-29a en el cáncer de seno suprime la expresión de TTP (tristetraprolina), una proteína implicada en la degradación de los 3'UTR de RNAs con regiones ricas en UA, evento que conduce a la EMT y metástasis en cooperación con la señalización del oncogén Ras (sarcoma de rata) (Gebeshuber *et al.*, 2009).

**Tabla 2.** Funciones de diferentes miRNAs en cáncer. Descripción de características asociadas a procesos tumorales en cáncer de seno. Tomado y Adaptado de Kai Ruan *et al.*, 2009.

Características en cáncer	Funciones de los miRNAs	miRNAs
Resistencia a señales antiproliferativas e independencia a factores exógenos de crecimiento	Pro-proliferativos	miR-21, Familia miR-17, miR-221, miR-222
Evasión de apoptosis	Anti-proliferativo Pro-apoptóticas	Let-7, miR-519, miR-146a Familia miR-34, miR-29, miR-15, miR-16
	Anti-apoptóticas	Familia miR-17-92, miR-21
Potencial limitado de replicación	Regulación de inmortalización o senescencia	miR-290, miR24, miR-34a
Inducción de angiogenesis	Pro-angiogenico	Familia miR-17-92, miR-378, miR-296, let-7f, miR27b, miR-130,miR-126.
	Anti-angiogenico	miR-15, miR-16, miR-20a, miR-20b.
Evasión del sistema inmune	Escape a inmunovigilancia	miR-155, Familia miR-17-92, miR-20a, miR-93, miR-106b, miR-372, miR-373, miR-520c, hcmv-miR- UL112.
Invasión de tejidos y metástasis	Pro-metastásicos	miR-10b,miR-21, miR-373, miR-520c, miR-155.
	Anti- metastásicos	Let-7, miR-335, miR-206,miR-126, miR-146a, miR-101, miR-200
Inestabilidad genómica	Promotor de inestabilidad genómica	Delección o regulación a la baja de miRNAs como miR-17, miR-20a, miR-15, miR-16 o let-7

## MicroRNAs como Marcadores de invasión tumoral

Un evento de metástasis representa un proceso complejo mediante el cual células de un tumor sólido primario invaden tejido adyacente y crecen en un tumor secundario (Tavazoie *et al.*, 2008). Las células de cáncer de seno tienen el potencial de diseminarse a casi cualquier parte del cuerpo donde continúan con su crecimiento y multiplicación. La expresión de gen CD44 está implicado en la adhesión celular y diferentes componentes de la matriz extracelular, se ha encontrado que su expresión está reducida durante la progresión de cáncer de seno a fenotipo metastático (López *et al.*, 2005). Los miRNA, miR-373 y miR-520c estimulan la migración e invasión de células de cáncer de seno humano mediante la supresión de la expresión de CD44 (Huang *et al.*, 2008), también el miR-21 promueve en las células de cáncer de seno los procesos de invasión y metástasis, por reconocimiento de múltiples genes supresores de tumor (Zhu *et al.*, 2008). Análogamente el miR-10b promueve la migración celular *in vitro* e inicia la invasión de tumor de seno *in vivo* mediante la regulación del gen HOXD10. (Ma *et al.*, 2007). El miR-10b está sobre regulado en células de cáncer de seno comparado con células epiteliales primarias de glándula mamaria humana o células MCF-10A y miR-10b está directamente regulado por TWIST mediante regulación transcripcional (Ma *et al.*, 2007). De modo similar TWIST promueve EMT y metástasis del tumor mamario (Yang *et al.*, 2004). La familia de miR-200 y el miR-205, regulan la EMT, que como es sabido es un paso fundamental en la metástasis de un tumor, y se ha establecido que la expresión de estos miRNAs esta disminuida en líneas celulares de cáncer de seno invasivo con un fenotipo mesenquimal.

En contraste los miRNAs, miR-126, miR-206 y miR-335 han sido identificados como miRNAs supresores de metástasis en cáncer de seno. (Tavazoie *et al.*, 2008) La expresión de miR-126 y miR-335 en tumores mamarios humanos esta inversamente asociado con recaída metastásica. La metástasis de cáncer de seno y migración son inhibidas por miR-335 que tiene como blanco el factor de transcripción SOX4, que se sabe regula el desarrollo celular y la migración (Tavazoie *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 2012).

## miRNAs en cáncer

La primera evidencia directa de la participación de miRNAs en cáncer, la hizo Calin y colaboradores en el 2002, durante el estudio de una delección en el cromosoma 13, la cual se presenta frecuentemente en LLC, donde encontraron 2 genes de miRNAs dentro de esta delección de 30 Kb, el mir-15 y mir-16. Al evaluar muestras de sangre de pacientes con LLC, encontraron que estos dos miRNAs estaban ausentes o regulados negativamente en la mayoría de los casos (68%), en

comparación con linfocitos de pacientes normales. Este hallazgo sugirió que estos dos miRNAs están causalmente involucrados en la patogénesis de la LLC. Poco después el mismo grupo identifico que el 50% de los genes miRNAs se ubican en regiones genómicas asociadas con cáncer, tales como sitios frágiles, regiones de pérdida de heterocigosidad mínima, en genes HOX, regiones de mínima amplificación y regiones comunes de rompimiento (Calin *et al.*, 2004). En soporte a esta evidencia, Cimmino y colaboradores en 2005, mostraron que el factor antiapoptótico Bcl2 está directamente regulado por miR-15 y miR16-1, donde funcionalmente comprobaron que estos miRNAs pueden ser considerados como nuevos reguladores de genes supresores de tumor. Además la pérdida o la baja regulación de miRNAs con potencial oncogénico, puede causar una sobreexpresión de los blancos a los cuales están dirigidos y en último promover la aparición de cáncer. Tal es el caso de miR-205 que fue reportado como inhibidor del potencial clonogénico de las células en cáncer de seno que mostraban un aumento de la respuesta a agentes anticancerígenos, consecuentes con la disminución en la regulación de ErbB3, miembro de la familia EGFR (Lorio *et al.*, 2009). Otros estudios han indicado que el miR-205 también regula negativamente la transición epitelio mesenquimal (EMT), evento clave en metástasis del cáncer. (Gregory *et al.*, 2008; Gandelli *et al.*, 2009).

En 2005, tres informes plantearon mecanismos, de cómo los miRNAs podría contribuir en la progresión tumoral. Dos estudios independientes, describieron la relación entre un grupo de miRNA, mir-17-92 y la vía oncogénica de Myc (He *et al.*, 2005; O'Donnell *et al.*, 2005). Un tercer informe demostró una interacción entre el miRNA let-7 y el protooncogen RAS (Johnson *et al.*, 2005).

Además de la evidencia de los miRNAs como supresores de tumor o como oncogenes, también se elucidó el rol de los miRNAs en la fisiología normal del seno, en un estudio realizado por Avril-Sassen y colaboradores en el 2009 se examinó la expresión de miRNAs en la glándula mamaria de ratones en edad juvenil y adulta, evaluando diferentes etapas como la de embarazo, lactancia e involución de la glándula (Avril-Sassen *et al.*, 2009). El hallazgo clave fue el encontrar miRNAs que se expresan en 7 grupos probablemente co-regulados durante el desarrollo de la glándula mamaria, hecho que conecta a varias familias de los miRNAs en distintas fases del ciclo de la glándula mamaria. Curiosamente, varios miRNAs (incluyendo miR-25 y el grupo miR-17-92) que previamente habían sido asociados con cáncer de seno agresivo basal también se encontraron sobre expresados durante la pubertad y la gestación, los períodos del pico fisiológico ductal y proliferación alveolar, lo que sugiere que pueden formar parte de un programa fisiológico de proliferación y también incidir en el crecimiento generado por tumores. Además, los miRNAs asociados con el fenotipo diferenciado final (por ejemplo, Let-7) aumentan

**Tabla 3.** miRNAs en metástasis. Se enlistan diversos miRNAs con su respectivo gen blanco y se describe si su acción es como promotor a represor de metástasis. Adaptado de Kai Ruan et al., 2009.

miRNAs	Blanco asociado	Función del miRNA en metástasis de tumor
miR-10b	HOXD10	Promotor
miR-21	PTEN, PDCD4, TPM1, Maspin	Promotor
miR-373	CD44, LATS2	Promotor
miR-520c	CD44	Promotor
miR-155	RhoA	Promotor
Let-7	Ras, HMGA2	Represor
miR-335	SOX4, TNC	Represor
miR-126	Crk, IRS-1	Represor
miR-146a	ROCK1	Represor
miR-101	EZH2	Represor
Familia miR-200	ZEB1, ZEB2	Represor

en la pubertad y la gestación, correlacionando con un aumento en la proporción de epitelio maduro. A diferencia de miR-29 que alcanza su máxima expresión durante la involución causada por la post-lactancia, con una reducción en la expresión de sus RNAm previstos como objetivos, hecho que favorece a los genes relacionados con la adhesión focal, lo que sugiere un papel del miR-29 en la remodelación de la glándula mamaria. Otro estudio identificó marcadores de células madre de cultivo de células epiteliales mamarias de ratón (Ibarra *et al.*, 2007), donde encontraron que Let-7 presenta delección en células progenitoras, mientras que miR-205 esta (en este sistema) como un marcador de fenotipo de células madre. Tales estudios de la función fisiológica de los miRNAs son esenciales para comprender cómo su desregulación influye en el fenotipo de cáncer de seno.

En la misma línea ahora se está investigando en la identificación de los blancos de los miRNAs con el fin de identificar las redes sobre las cuales inciden los miRNAs y de este modo entender como el sistema biológico se está comportando frente a cada cambio, con el fin de poder determinar en qué medida cada miRNA puede estar regulando un solo blanco o simultáneamente, más de una diana y que esta, a su vez pueda estar generando toda una cascada de señales que des-emboken en un fenotipo tumoral (Kim *et al.*, 2012).

Gracias al conocimiento sobre la participación de miRNAs en la iniciación, progresión y metástasis tumoral, y al descubrimiento de muchos miRNAs que imparten efectos supresores de tumor, al restaurar su expresión y pretender producir efectos terapéuticos se espera que estos emerjan como una opción terapéutica eficaz para el tratamiento de Cáncer (Romero *et al.*, 2012). Una clara síntesis fue expuesta por Liu en un artículo de revisión en el 2012, del cual se toma una de las

gráficas con el fin entender mucho más concretamente los diferentes miRNAs asociados con los diferentes estadios del seno y el proceso carcinogénico (figura 4).

Estos supresores MIR inhibidores de tumor y onco-miRs promotores de tumor son prometedores candidatos para la intervención terapéutica como terapia de reemplazo como Mir o antagonirs.

La lista de biomarcadores miRNA del panel inferior, codificados como MIR sobre regulados (en formato normal) y los MIR sub- regulados (subrayados), que mostraron expresión diferencial en MASCs normales / glándulas mamarias en comparación con los tumores primarios de mama. En el panel MaSC se expresan diferencialmente, let- 7b / c , miR- 205, -22, -93 y -200 en comparación con las células epiteliales diferenciadas; miR- 138, -431, y -133a /b se relacionan con las glándulas mamarias durante el embarazo y la lactancia, en comparación sin embarazo y en involución de la glándula. El panel Br Ca (cáncer de seno) presenta expresados diferencialmente MIR en cáncer de seno en comparación con el tejido normal de seno. El panel MIR de ER / PR relacionado con el estado de receptores de estrógenos ER o estado receptores de progestágenos PR (ER + o PR + tumores vs ER - o PR- tumores, respectivamente). Panel de Invasión muestra MIR regulados en los tumores con metástasis ganglionar (let- 7 y miR -9 -3) o invasión vascular (miR-10b, miR-123, miR-29a, miR-205, etc). El panel incluye DRFS arriba y MIR -regulado y relacionados con alto riesgo o mal pronóstico de pacientes ER + y ER- en tumor mama. Panel de resistencia a los medicamentos se enumeran MIR (algunos muestran los genes sobre los que actúan directamente) relacionado a resistencia a los medicamentos de las células de cáncer de seno o tumores primarios, tales como la resistencia a tamoxifeno de células MCF- 7 y tumores HER2 + / ER- (miR-221/222),



resistencia de células MDA- MB- 435 y 468 células a paclitaxel (miR-221/222 , - 125b) , resistencia a la doxorubicina de células MCF-7 (miR- 127 , 34a, 27b, 206 , 106a , 21 , 214 , y let-7) , y la resistencia a cisplatino de células MCF-7( miR- 146, -10a / b, -221 / 222, -29a / b , -206 , - 200b / c , -345 , -126, -205 y -342 ).

De modo similar miRNAs específicos han mostrado una expresión alterada en células tumorales resistentes a diferentes medicamentos, un ejemplo es mostrado en un estudio donde evaluaron la línea MCF-7, una variante resistente a fármacos que mostró estar asociada con disminución de los niveles de miR-451, miR-328 y miR-326 que regulan la expresión del gen de Resistencia a múltiples drogas (MDR1), la glicoproteína-P de resistencia a cáncer de seno (BCRP/ABCG2) y la proteína 1 asociada a resistencia a múltiples drogas (MRP-1/ABCC1), respectivamente. La reconstrucción de la expresión de los miRNAs sensibilizó las células a los efectos antiproliferativos de la doxorubicina (miR-451), mitoxantrone (miR-328) y VP-16(miR-326) en cada uno de los casos (Pan et al., 2009 and Wang et al., 2012).

### Perspectivas

Teniendo en cuenta las limitaciones de las actuales pruebas de detección de cáncer, el uso de miRNAs como marcadores tumorales para el diagnóstico y el pronóstico ha despertado interés en investigación. La detección y el tratamiento de cáncer es facilitado en gran medida por las tecnologías ómicas (Cho WC 2010b; Cascione et al., 2013). Aunque se hacen necesarias más investigaciones que evalúen los efectos de miRNAs mediante ensayos clínicos para superar las barreras de la presentación efectiva al RNAm blanco, mejorar la eficacia, estabilidad y minimizar toxicidades fuera del blanco. El interés en los miRNAs es ahora mayor que nunca y la literatura se está nutriendo rápidamente con los informes sobre los nuevos miRNAs, sus genes diana validados y el desarrollo de productos terapéuticos basados en miRNA que pretenden realizar un abordaje terapéutico basado en miRNA y la clínica de cada paciente.

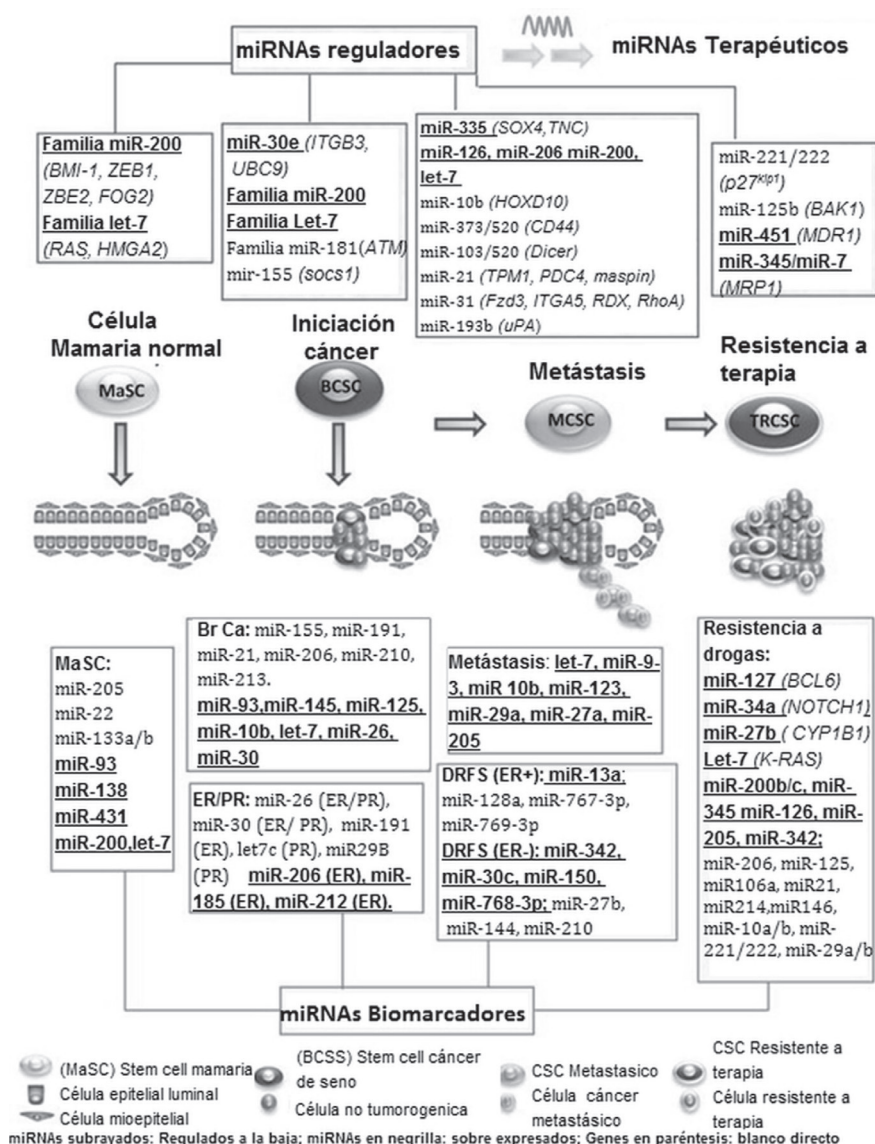
Microarrays de miRNA pueden identificar la expresión de varios cientos de genes en la misma muestra a la vez, mientras que requiere solamente pequeñas cantidades de RNA total (Yin et al., 2008). Estas tecnologías no sólo ayudan a identificar potenciales miRNAs supresores tumorales y oncogénicos, sino también ayudan a proporcionar una comprensión más completa de sus vías y los mecanismos base, de miRNAs específicos que están asociados con cáncer, células madre, metástasis y sensibilidad a fármacos. Los miRNAs pueden complementar otros biomarcadores genómicos y proteómicos para el diagnóstico y pronóstico del cáncer (Cho WC, 2007b) teniendo en cuenta que cada miRNA puede controlar a cientos de genes diana.

Aunque el desarrollo reciente de medios farmacológicos más eficaces para modular las actividades miR-

NA proporciona nuevas oportunidades terapéuticas, como la introducción de oligonucleótidos antisentido para reducir la expresión de miRNAs que pueden generar desvío de los efectos indeseables (Kota et al., 2009). Una muestra de ello es el estudio publicado por Kim y colaboradores en el 2011, donde mediante vectores virales se demuestra el efecto antitumoral del miR-145 en células de cáncer de seno, hecho que abre el camino hacia el uso de miR-145 como terapia antitumoral para el tratamiento de pacientes de cáncer de seno. Adicionalmente en un estudio se muestra que un agregado exógeno de miRNA (miR- 141) tiene un ritmo más lento de degradación y permanecía detectable por períodos más largos en placenta, lo que sugiere que los miRNAs tienen una mayor estabilidad que los RNAm incluso en ausencia de protección y estando sometido a la actividad nucleasa en el plasma, hechos que podrían potenciarse (por ejemplo, a través de asociación con partículas) (Chim et al., 2008).

Al surgir las implicaciones terapéuticas de miRNA, las estrategias basadas en miRNA pueden formular, antagonizar o restaurar las funciones de miRNAs. La tecnología de oligonucleótidos antisentido ya se está desarrollando utilizando la vía de RNAi para la terapia génica. Las aplicaciones de RNAi se basan en la sincronización entre un oligonucleótido y un RNAm. En la práctica, una falta de coincidencia solo puede conducir a una completa pérdida de silenciamiento (Brummelkamp et al., 2002) y por “los efectos fuera del blanco” está comprometida la especificidad de la identidad de la secuencia, que al realizar reconocimiento al azar de RNAm reprimen la expresión de genes no esperados. Si múltiples siRNAs se utilizan para la selección de múltiples hits, múltiples efectos fuera del objetivo pueden suceder. Las más recientes investigaciones han demostrado que mediante el diseño adecuado de la siRNAs, así como el uso de nucleótidos modificados, los efectos no específicos puede ser minimizados (Enders et al., 2009). Estos oligonucleótidos deben ser modificados químicamente para permitir la estabilidad en el suero y la captación celular. Dos estudios han aplicado con éxito 2'-O-Metil modificado, a RNA antisentido para inhibir la función de miRNA en cultivos celulares (Hutvagner et al., 2004; Meister et al., 2004).

La entrega de los inhibidores del miRNA o miRNAs sintéticos en las células es uno de los mayores desafíos para el desarrollo de esta solicitud. A pesar de los avances de los últimos años, es necesaria más investigación para obtener la aplicación sistemática de inhibidores de miRNA a su sitio de acción. Un trabajo reciente de Krutzfeldt et al., 2005 demostró que el RNA antisentido conjugado modificado con colesterol, designado “antagomirs” podría efectivamente inhibir la función de miRNA *in vivo* en ratón adulto. Los autores aplicaron tres inyecciones al día por vía intravenosa de antagomirs y la inhibición de miRNAs lograda fue efectiva durante un período de cuatro semanas en la mayoría de los tejidos, excepto cerebro (Krutzfeldt et al., 2005).



**Figura 4.** Un resumen de los reguladores y los biomarcadores miRNA en el desarrollo de la glándula mamaria normal, la iniciación del cáncer de seno, metástasis, y resistencia a la terapia. En estos cuatro procesos, las células madre mamarias (MaSC), células madre del cáncer de mama (BCSCs), CSC metastásicos (MCSCs) y células madre cancerosas resistentes a la terapia (TRCSCs) son creadores fundamentales y/o jugadores celulares críticos. La lista de los miRNA reguladores del panel superior, incluye los MIR supresores y oncomiRs que se muestran subrayados en la figura, presentes en el desarrollo normal de la glándula mamaria (originado - MASCs), la iniciación de cáncer de seno (mediada por BCSCs), la metástasis del cáncer de mama, y resistencia a la terapia, respectivamente, (Tomado Liu Huiping 2012).

Incluso el uso de la tecnología de LNA (ácidos nucleicos bloqueados) ha presentado un gran avance, del cual es ejemplo los ensayos clínicos con LNA-anti-miR-122 en fase I que ya se ha iniciado sobre la base de interesantes datos preliminares en primates no humanos (Elmen *et al.*, 2008). Además, se han logrado avances en los sistemas de entrega y la administración sistémica de miRNA mediante virus adeno-asociados (AAV) que han sido probados en modelos preclínicos (Kota *et al.*, 2009). Del mismo modo, los liposomas ca-

tiónicos o formulaciones de nanopartículas a base de polímeros, se pueden desarrollar para lograr la entrega de miRNA miméticos y aumentar la eficacia terapéutica.

Aunque los sistemas de vectores virales ofrecen opciones adicionales para presentación eficiente y órgano-específica, este enfoque debe superar las reservas sobre la base de la experiencia negativa con la terapia génica. La inhibición específica de un único gen objetivo es por lo general el intento a realizar, y la ex-

perencia en campo ha demostrado que secuencias antisentido pueden, en determinadas circunstancias, ser insuficiente para enfermedades complejas como el cáncer.

Por el contrario, los miRNAs afectan muchos RNAm objetivo, de modo que una regulación más completa se puede lograr con la inhibición de un solo miRNA. Por lo tanto, profundizar en el conocimiento del papel funcional de miRNAs abrirá nuevas oportunidades en el desarrollo revolucionario de estrategias terapéuticas para la quimioprevención del cáncer (Enders *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2009) generando un perfil de expresión de miRNA, que podrá clasificar el cáncer humano, generando micro-perfiles de expresión de RNA claramente diferenciados en tipos de cáncer humano según su origen en el desarrollo. Un subgrupo de productos de los tumores gastrointestinales que surgen de endodermo, se distinguió por patrones de expresión miRNA. Además, los tumores en un linaje de células individuales, como la leucemia linfoblástica aguda donde se diferenciaron de acuerdo con su subyacente anomalía genética en el BCR / ABL de tumores positivos, las células T tumorales, y aquellos con reordenamiento del gen MLL (Enders *et al.*, 2009).

Los miRNAs son útiles para el diagnóstico clínico, su ventaja clave podría ser su gran estabilidad. A diferencia de la mayoría de RNA mensajeros, los miRNAs son de larga duración *in vivo* (Lim *et al.*, 2005; Xi *et al.*, 2007) y muy estable *in vitro* (Tang *et al.*, 2006), lo que podría permitir el análisis de muestras embebidas en parafina para aplicaciones de diagnóstico de rutina.

Un enfoque se informó recientemente por Ebert *et al.*, 2010, ellos desarrollaron inhibidores del miRNA que puede ser expresada de forma transitoria en cultivos de células de mamíferos. Estos inhibidores competitivos denominados "esponjas miRNA" donde la esponja contienen RNA complementario a sitios de unión a un miRNA de interés, y son producidos a partir de transgenes en las células. Como con la mayoría de los genes miRNA, los sitios de unión de una esponja son específicos para el miRNA en la región "seed", lo que les permite bloquear una familia entera de miRNAs asociados. Este enfoque transgénico ha demostrado ser una herramienta útil para investigar las funciones del miRNA en una variedad de sistemas experimentales (Ebert *et al.*, 2010).

Una dirección diferente fue tomada por Tsuda *et al.*, 2005. Los autores diseñaron miRNAs sintéticos cuyo objetivo fue sobre expresar proteínas de tumor, como la proteína HER-2. Un miRNA sintético orientado al RNAm de HER-2 inhibió con éxito la expresión de la proteína HER-2 en las células de cáncer de ovario (Tsuda *et al.*, 2005). En conjunto, estos estudios tienen como promesa establecer miRNAs como futuras dianas terapéuticas. Una de las limitaciones de las terapias antisentido de RNA es el número limitado de células que pueden ser objeto. Cualquier enfoque para dele-

tar un miRNA antisentido particular, sólo dará lugar a una respuesta parcial. Esta puede representar una limitación para terapias contra el cáncer. Queda por ver, si los efectos indirectos en las células de cáncer que no han sido blanco directo, puede superar esta limitación.

Con interés cada vez mayor, los avances de la investigación en las funciones de miRNA y los adelantos tecnológicos, la terapéutica basada en miRNA pueden crear un cambio de paradigma en la medicina y la industria farmacéutica. Por lo tanto, con el aumento de conocimientos sobre los miRNAs asociadas a subtipos moleculares y las características clínico-patológicas de cáncer, se cree que los miRNAs puede resultar útiles como herramientas de diagnóstico y pronóstico en el futuro cercano.

Por el contrario, un efecto de función parcial puede ser de valor terapéutico en enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson o la enfermedad de Alzheimer. Una restauración parcial de la producción de dopamina por la terapia antisentido puede dar lugar a una mejoría clínica significativa en pacientes de Parkinson. Del mismo modo, una reducción parcial de las proteínas que causan la enfermedad de Alzheimer puede llevar a una mejoría clínica y podría ser alcanzable por bases genéticas de RNA o terapia miRNA. (Sassen *et al.*, 2008)

Por otro lado, como las células madre pueden regenerar y diferenciarse a distintos tipos celulares, son siempre un foco intenso de interés en investigación. Se ha informado que los miRNA juega un papel regulador en la vía de división de células madre, si este mecanismo contribuye a prevenir y tratar el cáncer será digno de estudio (Hatfield *et al.*, 2005)

## Conclusiones

En los últimos años, los miRNAs se han convertido en actores principales en las complejas redes de regulación génica y han sido implicados en diversos aspectos de las enfermedades humanas. La investigación de los miRNAs en cáncer de seno, han mejorado significativamente nuestra comprensión de la patogénesis de este cáncer. La atención se ha centrado en el estudio de oligonucleótidos antisentido y los métodos para inhibir la función de miRNA con tecnología de pequeños RNAi, para la sustitución de miRNAs y explorar su potencial como agentes terapéuticos. En esta línea diversos estudios han puesto de manifiesto que la caracterización de oncomiRs y antioncomiRs pueden generar clasificaciones más precisas en cáncer y predecir resultados a terapias de los pacientes, con alta exactitud.

Nuevo conocimiento sobre el papel funcional de oncomiRs está revolucionando la biología del cáncer y abrirá nuevas oportunidades en investigación biomédica. El análisis e identificación de transcritos diana en combinación de genómica, proteómica y miRómica podrán ayudar a delimitar el espectro de blancos que



son regulados por miRNAs, dejando abierto el campo de investigación para la generación de conocimiento, que permita mejorar la calidad de vida de nuestra población. Siempre habrá obstáculos en la batalla contra el cáncer, sin embargo, la identificación de miRNAs proporcionará interesantes oportunidades en el diagnóstico, pronóstico y la terapia personalizada del cáncer de seno. En un futuro próximo se podrían convertir en marcadores de blancos y su implementación será útil como una herramienta de investigación.

## Referencias bibliográficas

- Adams BD., Furneaux H., White BA. 2007. The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. *Mol. Endocrinol.* 21:1132-1147.
- Alvarez R.H. 2010. Present and future evolution of advanced breast cancer therapy. *Breast Cancer Res.* 12 (Suppl. 2) S1.
- Avril-Sassen S., Goldstein L.D., Stingl J., Blenkiron C., Le Quesne, J., Spiteri I., Karagavrilidou K., Watson C.J. 2009. Characterisation of microRNA expression in post-natal mouse mammary gland development. *BMC Genomics.* 10, 548.
- Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116(2): 281-297.
- Bentwich I. 2005. Prediction and validation of microRNAs and their targets. *FEBS Lett.* 579:5904-5910.
- Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai A., Einat P., Einav U., Meiri E., Sharon E., Spector Y., and Bentwich, Z. 2005. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nature genetics.* 37(7), 766-770.
- Berezikov, E., Cuppen, E., and Plasterk, R. H. 2006. Approaches to microRNA discovery. *Nature genetics.* 38, S2-S7.
- Bernstein E., Caudy AA., Hammond SM., Hannon GJ. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 409:363-366.
- Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin SF, Dunning MJ, Barbosa-Morais NL, Teschendorff AE, Green AR, Ellis IO, Tavaré S, Caldas C, Miska EA. 2007 MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol.* 8(10): R214.
- Borchert GM., Dance M., Weber M., and Cavaillé J. 2009. C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts. *Nucleic Acids Res.* 37(10): 3464-3473.
- Brennecke J., Stark A., Russell RB., Cohen SM. 2005. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 3:e85.
- Brummelkamp T.R., Bernards R., and Agami R. 2002. "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells," *Science.* 296: 550-553.
- Caldas C. and Brenton JD. 2005. Sizing up miRNAs as cancer genes. *Nat Med.* 11:712-714.
- Calin, G. A.; Cimmino, A.; Fabbri, M.; Ferracin, M.; Wojcik, S. E.; Shimizu, M.; Taccioli C, Zanesi N, Garzon R, Aqeilan RI, Alder H, Volinia S, Rassenti L, Liu X, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, and Croce, C. M. 2008. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 105(13): 5166-5171.
- Calin GA., Croce C M. 2006. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 6:857-866.
- Calin, G. A.; Dumitru, C. D.; Shimizu, M.; Bichi, R.; Zupo, S.; Noch, E.; Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F and Croce, C. M. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 99(24): 15524-15529.
- Calin, G. A.; Ferracin, M.; Cimmino, A.; Di Leva, G.; Shimizu, M.; Wojcik, S. E.; Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M and Croce, C. M. 2005. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine.* 353(17): 1793-1801.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. 2004. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 101(9): 2999-3004.
- Cascione L, Gasparini P, Lovat F, Carasi S, Pulvirenti A, Ferro A, Alder H, He G, Vecchione A, Croce CM, Shapiro CL, Huebner K. 2013. Integrated microRNA and mRNA signatures associated with survival in triple negative breast cancer. *PLoS one.* 8(2): e55910.
- Chen, C.-Z., 2005. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *The New England Journal of Medicine.* 353: 1768-1771.
- Chen L, Li Y, Fu Y, Peng J, Mo MH, Stamatakis M, Teal CB, Brem RF, Stojadinovic A, Grinkemeyer M, McCaffrey TA, Man YG, Fu SW. 2013. Role of deregulated microRNAs in breast cancer progression using FFPE tissue. *PLoS one.* 8(1): e54213.
- Chim, S. S.; Shing, T. K.; Hung, E. C.; Leung, T. Y.; Lau, T. K.; Chiu, R. W.; and Lo, Y. D. 2008. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clinical Chemistry.* 54(3):482-490.
- Cho WC. 2007. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer.* 6(1):60.
- Cho WC. 2007b. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Mol Cancer.* 6(25):25-27.
- Cho, W. 2010. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 42(8): 1273-1281.
- Cho WC. 2010b. Omics approaches in cancer research. In: Cho WC, editor. An omics perspective on cancer research. New York/Berlin: Springer; 1-9.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 102, 39. 13944-13949.
- Croce CM. 2009. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet.* 10: 704-714.
- Ebert Margaret S. y Sharp Phillip A. 2010. MicroRNA sponges: Progress and possibilities. *RNA* November 16: 2043-2050.
- Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjörn M, Hansen HF, Berger U, Gullans S, Kearney P, Sarnow P, Straarup EM, Kauppinen S. 2008. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature.* 452(7189):896-899.
- Filipowicz, Witold, Bhattacharyya, Suvendra N., Sonenberg, Nahum. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 9:102-114.
- Frankel LB., Christoffersen NR., Jacobsen A., Lindow M., Krogh A., Lund AH. 2008. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 283:1026-1033.
- Gandellini P, Folini M, Longoni N, Pennati M, Binda M, Colechia M, Salvioni R, Supino R, Moretti R, Limonta P, Valdagni R, Daidone MG, Zaffaroni N. 2009. miR-205 exerts tumor-suppressive functions in human prostate through down-regulation of protein kinase cepsilon. *Cancer Res.* 69. 2287-95.
- Gebeshuber CA., Zatloukal K., Martinez J. 2009. miR-29a suppresses tristetraprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis. *EMBO* 10(4):400-5.



- Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ. 2008. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature Cell Biology*. 10(5): 593-601.
- Hatfield, S. D.; Shcherbata, H. R.; Fischer, K. A.; Nakahara, K.; Carthew, R. W.; and Ruohola-Baker, H. 2005. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature*. 435(7044), 974-978.
- He L.; Hannon, G. J. 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*. 5(7): 522-531.
- He L., Thomson JM., Hemann MT., Hernando-Monge E., Mu D., Goodson S., Powers S., Cordon-Cardo C., Lowe SW., Hannon GJ., Hammond SM. 2005. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 435:828-833.
- Huang Q., Gumireddy K., Schrier M., le Sage C., Nagel R., Nair S., Egan DA., Li A., Huang G., Klein-Szanto AJ., Gimotty PA., Katsaros D., Coukos G., Zhang L., Pure E., Agami R. 2008. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol*. 10:202-210.
- Hui AB, Shi W, Boutros PC, Miller N, Pintilie M, Fyles T, McCready D, Wong D, Gerster K, Waldron L, Jurisica I, Penn LZ, Liu FF. 2009. Robust global micro-RNA profiling with formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer tissues. *Laboratory investigation*. 89(5): 597-606.
- Hutvagner G., McLachlan J, Pasquinelli AE., Balint E., Tuschl T., Zamore PD. 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 293:834-838.
- Hutvagner G., Simard MJ., Mello CC., Zamore PD. 2004. Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol*. 2:E98.
- Hutvagner G. and Zamore P D. 2002. RNAi: nature abhors a double strand. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 12, 225-232.
- Ibarra I., Erlich Y., Muthuswamy S.K., Sachidanandam R., Hannon G.J. 2007. A role for microRNAs in maintenance of mouse mammary epithelial progenitor cells. *Genes Dev*. 21: 3243.
- Lorio MV, Casalini P, Piovan C, Di Leva G, Merlo A, Triulzi T, Ménard S, Croce CM, Tagliabue E. 2009. microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer. *Cancer research*. 69(6): 2195-2200.
- Jackson RJ., Standart N. 2007. How do microRNAs regulate gene expression? *Science Signaling*. 2007(367), re1.
- Johnson SM., Grosshans H., Shingara J., Byrom M., Jarvis R., Cheng A., Labourier E., Reinert KL., Brown D., Slack FJ. 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 120:635-647.
- Kai Ruan, Xiaoguang Fang, Gaoliang Ouyang. 2009. MicroRNAs: Novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Letters*. 285(2): 116-126.
- Kent O. A. y Mendell J. T. 2006. A small piece in the cancer puzzle: MicroRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene*. 25(46): 6188-6196.
- Kim Junil, Choi Minsoo, Kim Jeong-Rae, Jin Hua, Narry Kim V. and Cho Kwang-Hyun. 2012. The co-regulation mechanism of transcription factors in the human gene regulatory network. *Nucleic Acids Research*. 40(18): 8849-8861
- Kim S.J., Oh J.S., Shin J.Y., Lee K.D., Sung K.W., Nam S.J., Chun K.H. 2011. Development of microRNA-145 for therapeutic application in breast cancer. *Journal of Controlled Release*. 155: 427-434.
- Kim, V. N. 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(5), 376-385.
- Kondo, N.; Toyama, T.; Sugiura, H.; Fujii, Y.; and Yamashita, H. 2008. miR-206 Expression Is Down-regulated in Estrogen Receptor  $\alpha$ -Positive Human Breast Cancer. *Cancer research*. 68(13): 5004-5008.
- Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, Chang TC, Vivekanandan P, Torbenson M, Clark KR, Mendell JR, Mendell JT. 2009. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell*. 137(6): 1005-1017.
- Krutzfeldt J., Rajewsky N., Braich R., Rajeev KG., Tuschl T., Manoharan M., Stoffel M. 2005. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*. 438:685-689.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 294:853-858.
- Lau N.C., Lim L. P., Weinstein E. G., Bartel D. P. 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 294: 858-862.
- Lee R.C., Ambros V. 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 294: 862-864.
- Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S., Kim VN. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 425:415-419.
- Lewis BP., Burge CB., Bartel D.P. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 120:15-20.
- Lewis, B. P.; Shih, I. H.; Jones-Rhoades, M. W.; Bartel, D. P.; and Burge, C. B. 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 115(7): 787-798.
- Li Mengfeng, Li Jun, Ding Xiaofan, He Mian and Cheng Shi-Yuan. 2010. microRNA and Cancer. *AAPS Journal*. 12: 309-317.
- Li W., Duan R., Kooy F., Sherman SL., Zhou W., Jin P. 2009. Germline mutation of microRNA-125a is associated with breast cancer. *J Med Genet*. 46:358-60.
- Lim LP., Lau NC., Garrett-Engle P., Grimson A., Schelter JM., Castle J., Bartel DP., Linsley PS., Johnson JM. 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 433:769-773.
- Liu Huiping. 2012. MicroRNAs in breast cancer initiation and progression. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 69(21): 3587-3599.
- Lopez JL., Camenisch TD., Stevens MV., Sands BJ., McDonald J., Schroeder JA. 2005. CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. *Cancer Res*. 65:6755-6763.
- Lorio, M.V., Ferracin, M., Liu, C.-G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Ménard, S., Palazzo, J.P., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, G.A., Querzoli, P., Negrini, M., Croce, C.M. 2005. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Research*. 16: 7065-7070.
- Lowery AJ, Miller N, Devaney A, McNeill RE, Davoren PA, Lemetre C, Benes V, Schmidt S, Blake J, Ball G, Kerin MJ 2009. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 11(3):R27.
- Lu J., Getz G., Miska EA., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D., Sweet-Cordero A., Ebert BL., Mak RH., Ferrando AA., Downing JR., Jacks T., Horvitz HR., Golub T., 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 435:834-838.
- Lujambio A., Ropero S., Ballestar E., Fraga MF., Cerrato C., Setien F., Casado S., Suarez-Gauthier A., Sanchez-Cespedes M., Gitt A., Spiteri I., Das PP., Caldas C., Miska E, Esteller M. 2007. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res*. 67:1424-1429.
- Lu L, Katsaros D, Shaverdashvili K, Qian B, Wu Y, de la Longrais IA, Preti M, Menato G, Yu H. 2009. Pluripotent factor lin-28 and its homologue lin-28b in epithelial ovarian cancer and their associations with disease outcomes and expression of let-7a and IGF-II. *European Journal of Cancer*. 45(12): 2212-2218.
- Ma L., Teruya-Feldstein J., Weinberg RA. 2007. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*. 449:682-688.
- Mayr C., Hemann MT., Bartel DP. 2007. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science*. 315:1576-1579.
- Meister G., Landthaler M., Dorsett Y., Tuschl T. 2004. Sequence specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA*. 10:544-550.

- Nakamura T., Canaani E., Croce CM. 2007. Oncogenic All1 fusion proteins target Drosha-mediated microRNA processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:10980–85.
- Ng, E. K.; Wong, C. L.; Ma, E. S.; and Kwong, A. 2009. MicroRNAs as new players for diagnosis, prognosis, and therapeutic targets in breast cancer. *Journal of oncology*. 30, 542-6.
- O'Day E, Lal A. 2010. Review MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 12(2):201.
- O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. 2005. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. 435:839–843.
- Pan YZ., Morris ME., Yu AM. 2009. MicroRNA-328 negatively regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human cancer cells. *Mol Pharmacol*. 75:1374–9.
- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. 2007. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol*. 17:118–126.
- Rajewsky N. 2006. microRNA target predictions in animals. *Nat Genet*. 38 Suppl: S8–S13.
- Rodriguez, A.; Griffiths-Jones, S.; Ashurst, J. L.; and Bradley, A. 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research*. 14(10a): 1902-1910.
- Romero-Cordoba Sandra, Rodriguez-Cuevas Sergio, Rebollar-Vega Rosa, Quintanar-Jurado Valeria, Maffuz-Aziz, Jimenez-Sanchez Antonio, Bautista-Piña Veronica, Arellano-Llamas Rocío, and Hidalgo-Miranda Alfredo. 2012. Identification and Pathway Analysis of microRNAs with No Previous Involvement in Breast Cancer. *PLoS One*. 7(3): e31904.
- Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA. 2006. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatinmodifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*. 9:435–443.
- Sassen, S.; Miska, E. A.; and Caldas, C. 2008. MicroRNA—implications for cancer. *Virchows Archiv*. 452(1): 1-10.
- Scott G. K., Goga A., Bhaumik D., Berger C. E., Sullivan C. S., y Benz C. C., 2007. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *The Journal of Biological Chemistry*. 282( 2): 1479–1486.
- Sempere LF, Christensen M, Silahatoglu A, Bak M, Heath CV, Schwartz G, Wells W, Kauppinen S, Cole CN. 2007. Altered microRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer Research*. 67(24): 11612-11620.
- Shirdel EA., Xie W., Mak TW., Jurisica I. 2011. NAViGaTing the micronome—using multiple microRNA prediction databases to identify signalling pathway-associated microRNAs. *PLoS one* 6: e17429.
- Shimono Y, Zabala M, Cho RW, Lobo N, Dalerba P, Qian D, Diehn M, Liu H, Panula SP, Chiao E, Dirbas FM, Somlo G, Pera RA, Lao K, Clarke MF. 2009. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell*. 138: 592–603.
- Si ML., Zhu S., Wu H., Lu Z., Wu F., Mo YY. 2007. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 26: 2799–2803.
- Takamizawa J., Konishi H., Yanagisawa K. 2004. “Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival,” *Cancer Research*. 64(11): 3753–3756.
- Tang F., Hajkova P., Barton SC., Lao K., Surani MA. 2006. MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*. 34:9.
- Tavazoie SF., Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, Gerald WL, Massague J. 2008. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*. 451:147–152.
- Thomson JM., Newman M., Parker JS., Morin-Kensicki EM., Wright T., Hammond SM. 2006. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev*. 20:2202–2207.
- Tsuda N., Kawano K., Efferson CL., Ioannides CG. 2005. Synthetic microRNA and double-stranded RNA targeting the 3′-untranslated region of HER-2/neu mRNA inhibit HER-2 protein expression in ovarian cancer cells. *Int J Oncol*. 27:1299–1306.
- Ventura A., Young AG., Winslow MM., Lintault L., Meissner A., Erkeland SJ., Newman J., Bronson RT., Crowley D., Stone JR., Jaenisch R., Sharp PA., Jacks T. 2008. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*. 132:875–886.
- Veronesi U., Boyle P., Goldhirsch A., Orecchia R., Viale G. 2005. *Breast cancer, Lancet*. 365 :1727–1741.
- Wang H, Tan G, Dong L, Cheng L, Li K, Wang Z, Luo H. 2012. Circulating MiR-26b as a Marker Predicting Chemoresistance in Breast Cancer. *PLoS ONE*. 7(4).
- Wu F., Zhu S., Ding Y., Beck WT., Mo YY. 2009. MicroRNA-mediated regulation of Ubc9 expression in cancer cells. *Clin Cancer Res*. 15: 1550–7.
- Xi, Y.; Nakajima, G.; Gavin, E.; Morris, C. G.; Kudo, K.; Hayashi, K.; and Ju, J. 2007. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Rna*. 13(10): 1668-1674.
- Yan, L.-X., Huang, X.-F., Shao, Q., Huang, M.-Y., Deng, L., Wu, Q.-L., Zeng, Y.-X., Shao, J.-Y. 2008. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *Rna*. 11: 2348-2360.
- Yang J., Mani SA., Donaher JL., Ramaswamy S., Itzykson RA., Come C., Savagner P., Gitelman I., Richardson A., Weinberg RA. 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. 117:927–939.
- Yang Y., Chaerkady R., Beer MA., Mendell JT., Pandey A. 2009. Identification of miR-21 targets in breast cancer cells using a quantitative proteomic approach. *Proteomics*. 9:1374–84.
- Yarden Y., Sliwkowski MX. 2001: Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev*. 2:127–137.
- Yin JQ., Zhao RC., Morris KV. 2008. Profiling microRNA expression with microarrays. *Trends Biotechnol*. 26:70–6.
- Yong Sun Lee and Anindya Dutta, 2009. Micro RNAs in Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*. 4:199–227.
- Yu Z., Wang C., Wang M., Li Z., Casimiro MC., Liu M., Wu K., Whittle J., Ju X., Hyslop T., McCue P., Pestell RG. 2008. A cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation. *J Cell Biol*. 182:509–517.
- Zhang B., Pan X., Cobb GP., Anderson TA. 2007. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*. 302(1):1–12. Zhu S., Wu H., Wu F., Nie D., Sheng S., Mo YY. 2008. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res*. 18:350–359.
- Zhu, J. Y.; Pfuhl, T.; Motsch, N.; Barth, S.; Nicholls, J.; Grässer, F.; and Meister, G. 2009. Identification of novel Epstein-Barr virus microRNA genes from nasopharyngeal carcinomas. *Journal of virology*. 83(7): 3333-3341.

# El dicloruro de mercurio como desinfectante en la micropropagación del comino (*Aniba perutilis* Hemsley)



## Dichloride of mercury as a disinfectant in the micropropagation of cumin (*Aniba perutilis* Hemsley)

Beltrán Pedroza Diana Marcela\*, Mesa López Neftalí\*\*

### Resumen

El comino, *Aniba perutilis* Hemsley, especie de importancia económica por la resistencia, duración y excelente calidad de su madera; desde el punto de vista ecológico es importante para la sobrevivencia de especies animales como el guácharo y guacamayas. Es reportada por el Instituto Von Humboldt, como especie en peligro crítico (CR), debido principalmente a la sobre explotación de reductos de bosques donde aún se encuentran algunos ejemplares y al escaso conocimiento de su fenología y reproducción (Cárdenas y Salinas, 2006). El uso de técnicas de micropropagación, constituye una de las formas de conservación, para lo cual se hace necesario superar la fase de inducción en la cual se presentan problemas de contaminación de los explantes. Se desarrolló un protocolo de desinfección que permitió el establecimiento *in vitro* de la especie. La desinfección se inició desde el momento de la recolecta de los explantes sumergiéndolos en una solución de yodo+antifúngico (Benomil, 3gr/500 ml), llamada solución transportadora. El mejor resultado en el control de la contaminación fue utilizando Tween 80 (1 gota/100 ml) por 10 minutos y 20 minutos de inmersión en dicloruro de mercurio ( $HgCl_2$ ) al 0,2%, con un 8% de contaminación. En contraste con el tratamiento con hipoclorito de sodio ( $NaClO$ ) que arrojó un 80% de contaminación; por lo que se puede afirmar que el dicloruro de mercurio es un desinfectante efectivo para el control de la contaminación de hongos y bacterias endógenas de los explantes de yemas, tanto apicales como laterales, de *A. perutilis* Hemsley.

**Palabras claves:** Desinfección, cultivo *in vitro*, solución transportadora, meristemos, contaminación.

### Abstract

Cumin, *Aniba perutilis* Hemsley, a species of economic importance for its strength, durability and excellent quality of its wood; from an ecological point of view it's important for the survival of species and animals such as macaws and guacharo. It is reported by Von Humboldt Institute as Critically Endangered (CR), mainly due to over-exploitation of forest redoubts where there are still some copies and limited knowledge of phenology and reproduction (Cardenas and Salinas, 2006). The use of micropropagation techniques is one of the methods of preservation, whereby it's necessary to overcome the induction phase where there is possibility of contamination of the explants. We developed a disinfection protocol which was achieved *in vitro* establishment of *Aniba perutilis* Hemsley. Initial disinfection was determined from the time of collection of the explants, which were placed in plastic boxes, previously disinfected with 96% alcohol, a solution of iodine + antifungal (Benomyl, 3grs/500 ml) called carrier solution. The best result in the contamination control was achieved using Tween 80 (1 drop / 100 ml) for 10 minutes and 20 minutes immersion in mercury dichloride ( $HgCl_2$ ) 0.2% with an 8% of contamination. Opposed to the treatment with sodium hypochlorite ( $NaClO$ ), this showed an 80% contamination, for which one can attest that the mercury dichloride is an effective disinfectant for the control of fungal and bacterial contamination of the explants endogenous buds, both apical and lateral *A. perutilis* Hemsley

**Key words:** disinfection, *in vitro* culture, carrier solution, buds, contamination.

**Recibido:** abril 18 de 2013

**Aprobado:** abril 4 de 2014

\* Msc. en Ciencias Biológicas, Investigadora grupo de Genética y Biotecnología de la Universidad del Tolima (GEBIUT), Universidad del Tolima (Ibagué), Colombia. dianamabelbiology@gmail.com

\*\* Mg en Dirección Universitaria. Director grupo de Genética y Biotecnología de la Universidad del Tolima (GEBIUT), Docente Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima. nmesa@ut.edu.co



## Introducción

El comino, *Aniba perutilis* Hemsley, pertenece a la familia Laurácea. Aunque presenta un amplio rango de distribución, su mejor desarrollo se da entre los 500 a 2600 msnm (Obregón, 2006), adaptándose a diferentes tipos de bosque: húmedo tropical, premontano, pluvial tropical, húmedo montano bajo, muy húmedo montano bajo, húmedo premontano y muy húmedo premontano, según clasificación de Holdridge (1978). El comino es una especie reportada por el Instituto Von Humboldt, como especies en peligro de extinción. Esto debido principalmente a la sobre explotación de los reductos de bosques donde aún se encuentran algunos ejemplares y al escaso conocimiento de su fenología y reproducción. (Cárdenas y Salinas, 2006).

Esta situación aunada a la dificultad de obtención de semilla viable para su reproducción, hace necesario la búsqueda de alternativas para su propagación y garantizar la supervivencia de la especie. Dentro de estas alternativas se contempla el uso de técnicas biotecnológicas como el cultivo *in vitro*, el cual permite obtener material suficiente para satisfacer la demanda de cultivo de la especie con fines económicos y ecológicos y a su vez ayudar a la reforestación y recuperación de especies que se encuentran en peligro por el deterioro de sus ecosistemas. La aplicación de estas técnicas presenta algunas barreras como la contaminación endógena y la oxidación de los explantes lo que conlleva a una gran pérdida de material vegetal, debido a que los explantes son tomados de árboles adultos expuestos a todos los factores contaminantes en las condiciones de un bosque natural, además se debe tener en cuenta la poca disponibilidad de material cuando se trata de especies en peligro de extinción.

El éxito de los sistemas de propagación de plantas por biotecnología depende en gran medida del control y prevención de la contaminación microbiana. Los microorganismos provocan pérdidas cuantiosas de material vegetal en los procesos productivos o de investigación. En las zonas tropicales, si no se tiene en cuenta, este problema puede alcanzar proporciones incalculables por que las condiciones climáticas favorecen el desarrollo y multiplicación de los microorganismos (Hernández y Gonzales, 2010).

El control de la contaminación en especies vegetales ha sido más dispendioso debido fundamentalmente a la contaminación endógena que presentan los explantes cuando son tomados directamente de campo, en su mayoría especímenes adultos altamente afectados por las condiciones adversas de su hábitat natural. (Materán, *et al.*, 2008)

El objetivo de este trabajo es evaluar procedimientos de desinfección superficial durante el establecimiento *in vitro* de explantes de Comino (*Aniba perutilis* Hemsley), para controlar la contaminación endógena del material vegetal recolectado en campo.

## Materiales y métodos

### **Ubicación de la zona de estudio y localización de plantas madre de *A. Perutilis* Hemsley**

Con base en la revisión de literatura relacionada con *A. perutilis*, inventarios florísticos de la especie y la realización de muestreos previos, se visitaron los siguientes sitios: Reserva Nirvana en el municipio de Palmira (Valle), Vereda San Andrés del municipio de Dolores (Tolima), Ataco en los corregimientos de Santiago Perez: veredas Casa de Zinc y La Miranda, y Vereda Coello - Cocora, finca La Vega Larga.

### **Obtención de explantes**

En la finca Vega Larga (Coello-Cocora) se encuentra un **árbol de *A. perutilis* Hemsley** de 3 metros de altura y aproximadamente 5 años, a una hora de distancia del laboratorio de protección de plantas, lo cual permitió realizar tratamientos previos a la recolección del material, como la fumigación con antifúngico e insecticida a fin de controlar microorganismos patógenos e insectos que podían dañar la planta; además la poda de las ramas para obtener los explantes: segmentos nodales y yemas de ramas juvenilizadas. Debido a esto la mayor cantidad de tratamientos realizados fueron con explantes tomados de esta planta madre juvenil.

### **Tratamientos de desinfección**

Ante la dificultad presentada en la obtención de plantas jóvenes, debido a la no consecución de árboles en período de fructificación y al escaso resultado en obtención de brotes en estacas, se trabajo con explantes tomados directamente de árboles en campo, con las consecuentes dificultades en el control



de la contaminación. Esta etapa requirió de permanentes modificaciones al protocolo de desinfección probándose en total ocho (8) tratamientos para yemas (tabla 1), y once (11) tratamientos para segmentos nodales, estos últimos, resultaron no apropiados para la micropropagación, debido al difícil control de contaminación, esto puede radicar en que es un explante con tejidos lignificados, de mayor tamaño que las yemas, en los que el riesgo de aparición de patógenos aumenta; además, este tejido está más expuesto al ambiente comparado con los meristemas que por ser tejido indiferenciado en los que no hay aún presencia de tejidos vasculares y el domo meristemático está protegido por un par de primordios foliares que lo aísla y preserva de la contaminación, son convencionalmente utilizados en la generación de plantas libres de patógenos, especialmente de virus, micoplasmas, bacterias y hongos (Pedroza, 2008).

La mayoría de los ensayos con segmentos nodales arrojó un 100% de contaminación, por lo que no se muestran datos y se suspende su uso en el desarrollo de este trabajo, más teniendo en cuenta los resultados favorables con la utilización de yemas, con las cuales se obtuvieron respuestas exitosas en menor tiempo y sin el peligro subsecuente de la oxidación del material.

Los explantes se sembraron en medio Murashige y Skoog (1962) (MS).

**Tabla 1.** Tratamientos utilizados en la desinfección de explantes de yemas de *Aniba perutilis* Hemsley.

Tratamiento *	Solución desinfectante	Concentración (%)	Tiempo de inmersión (min)	Solución de transporte **
TDY1	NaClO	2%	5 min	1
TDY2	NaClO	1%	60 min	1
TDY3	NaClO + vinagre	1% + 10%	60 min	1
TDY4	NaClO + OH	1% + 70%	60 min	0
TDY5	HgCl <sub>2</sub>	0,15	20 min	1
TDY6	HgCl <sub>2</sub>	0,15	20 min	0
TDY7	HgCl <sub>2</sub>	0,20	20 min	1
TDY8	HgCl <sub>2</sub>	0,20	20 min	0

\* TDY: Tratamiento de Desinfección Yema

\*\* Presencia (1) Ausencia (0)

### Análisis estadístico

El modelo estadístico utilizado fue al azar teniendo en cuenta como Variables respuesta contaminación, oxidación y brotación. La validez estadística de los resultados se comprobó con la prueba de Shapiro-Wilks (1965), para determinar la normalidad de los datos, seguido del análisis de varianza con prueba de Bonferroni (1939), para la comparación múltiple de medias a un nivel de significancia  $P = 0.05$ , la información fue procesada con el software estadístico Infostat/E versión estudiantil 2010.

### Resultados y discusión

#### *Inventario de los árboles de A. perutilis hemsley encontrados en las zonas de estudio seleccionadas*

La distribución de *A. perutilis* Hemsley ha sido reportada en Colombia por diferentes autores desde la Costa del Pacífico, y en los departamentos de Sarare (Arauca), Antioquia, Caldas, Llanos Orientales, Chocó, Santander, Valle del Cauca, Risaralda, Huila, Meta y en estribaciones de las Cordilleras Occidental y Central (Obregón, 2006; Santamaría, 2005); pero no se conocen reportes en el departamento del Tolima, debido a la escasa población que se encuentra en estos momentos por la sobreexplotación a la que es sometida, se realiza el primer reporte de esta especie en el departamento del Tolima (tabla 2).





**Tabla 2.** Inventario de *A. perutilis* Hemsley en las zonas de estudio en el departamento del Tolima.

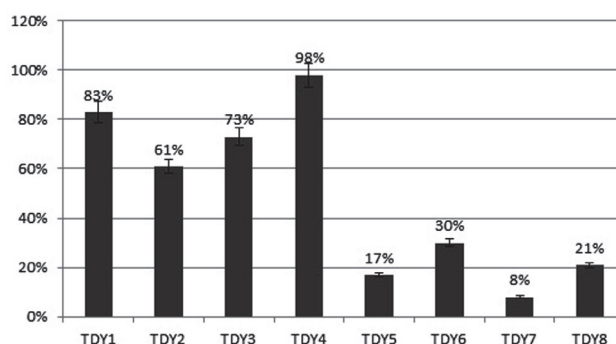
Localidad registrada	Ubicación y altura	Censo
Vereda San Andrés Municipio de Dolores (Tolima)	1200 m.s.n.m.	2 árboles adultos Entre 15 – 20 metros de altura
Ataco en los corregimientos de Santiago Perez: veredas Casa de Zinc y La Miranda	1600 m.s.n.m.	16 árboles adultos 10 metros de altura aprox.
Vereda Coello –Cocora, finca La Vega Larga.	1.160 - 1200 m.s.n.m.	1 árbol juvenil 3 metros de altura aprox.
Vereda Olla grande (Icononzo – Tolima)	1.497 m.s.n.m.	1 árbol adulto 20 metros de altura aprox.

Fuente: Autor

Aunque el *A. perutilis* Hemsley ha sido registrado desde el nivel del mar hasta los 2.600 m.s.n.m., (Hurtado, 2007) los pocos individuos hallados durante este estudio en el departamento del Tolima no superaron los 2.000 m.s.n.m.; en Ataco (vereda Casa de Zinc), se halló una cantidad considerable de individuos de *A. perutilis* Hemsley gracias a que en esta zona se está trabajando en la reforestación de la especie; en los otros sitios sólo se encontraron dos o tres individuos o a veces solo uno. Esta situación dificultó la recolección de muestras, seleccionándose finalmente la vereda vega larga como sitio de colecta.

### Yemas

Inicialmente se realizaron ensayos con Hipoclorito de Sodio ( $\text{NaClO}$ ) a diferentes concentraciones y tiempos de inmersión cortos (5 minutos), solo cuatro de estos produjeron un control leve de contaminación en las yemas apicales y laterales. Al no obtener buenos resultados se modificaron estas variables y se empleó otra solución desinfectante: el dicloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ). Se realizaron tratamientos de desinfección tanto para yemas como para segmentos, obteniendo, en todos los tratamientos en los que se usó el dicloruro de mercurio, importantes reducciones en el porcentaje de contaminación, con respecto a los tratamientos en los que se utilizó el hipoclorito de sodio. (figura 1).

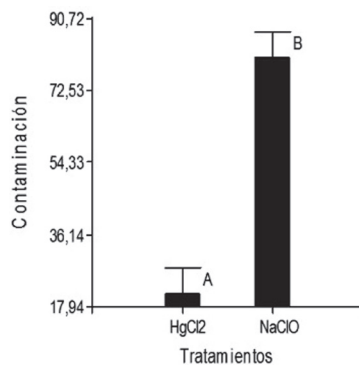


**Figura 1.** Porcentaje de Contaminación en los tratamientos de desinfección evaluados para yemas de *A. perutilis* Hemsley.

La prueba de Shapiro-Wilks determinó la normalidad de los datos. Al realizar el análisis de varianza, se comparó las medias de los tratamientos mediante la prueba de Bonferroni. Se encontraron diferencias significativas entre los desinfectantes utilizados ( $\text{NaClO}$  –  $\text{HgCl}_2$ ), obteniéndose con dicloruro de mercurio una media de 22,73 lo que indica una alta sobrevivencia de los explantes de yemas, en comparación con el hipoclorito de sodio que obtuvo una media de 81, es decir, presentó mayor contaminación (figura 2).

El dicloruro de mercurio resultó ser un desinfectante muy efectivo para el control de la contaminación de hongos y bacterias endógenas de los explantes de yemas de *A. perutilis* Hemsley. Sin embargo por ser un producto tóxico, debe ser utilizado con mucha cautela, ya que tiene la capacidad de impregnarse en la piel y causar intoxicación con el mercurio; preparada como solución es mas peligrosa, puesto que a medida que se va secando en la piel, ésta, lo absorbe (George, 1993).

En especies forestales se ha evaluado la eficiencia del  $HgCl_2$ , por ejemplo, en *Aspidosperma polyneuron* fue mas eficiente que el  $NaClO$  en la desinfección de brotes apicales (Ribas *et al.*, 2003). Este producto ha sido utilizado con éxito, para muchas especies leñosas que presentan serios problemas de contaminación por microorganismos, como relata Bennett y Davies JR (1986), Chalupa (1990), Purchit *et al.*, (1994) y Patnaik and Debata (1996).

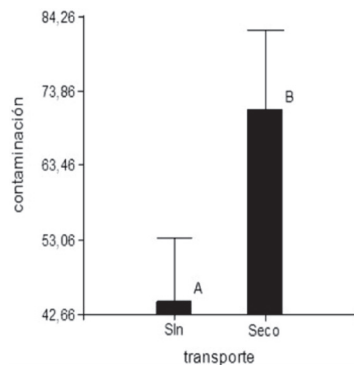


Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

**Figura 2.** Comparación de la contaminación respecto a las medias de los tratamientos de desinfección aplicados a yemas de *A. perutilis* Hemsley.

Con la prueba de Bonferroni, se realizó la comparación de medias entre las dos formas de transporte que se utilizó para llevar el material colectado de campo al laboratorio, el cual fué: en seco (0) y en la Solución transportadora (1), la cual contenía una solución de yodo + antifúngico (Benomil, 3gr/500 ml), encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos; mostrando mejores resultados en el control de la contaminación de los explantes inmersos en la solución transportadora con una media de 44,55 de contaminación comparada con 71,33 correspondiente a la media de los explantes transportados en seco (figura 3).

Respecto a los tratamientos con hipoclorito de sodio ( $NaClO$ ), se encontró que al reducir la concentración (1%) y aumentar el tiempo de exposición del material vegetal a una hora y con la solución transportadora de antifungico + yodo, el porcentaje de sobrevivencia fue mayor en comparación con los otros tratamientos con hipoclorito.

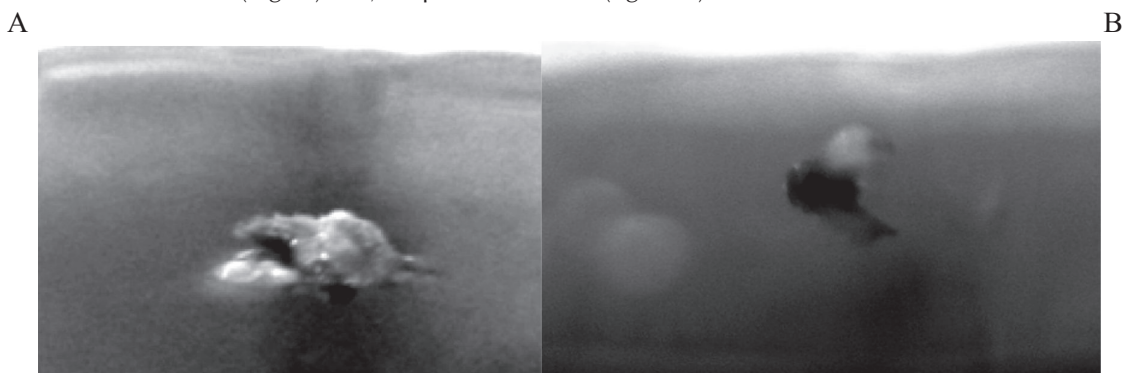


Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Sln: Solución Transportadora. Seco: Sin solución transportadora

**Figura 3.** Comparación de la contaminación respecto a las medias de los métodos de transporte de yemas de *A. perutilis* Hemsley.

Al analizar los tratamientos de desinfección, la mejor respuesta se obtuvo con yemas de *A. perutilis* Hemsley transportadas en solución antifúngica 90% + yodo 10%, y desinfectadas en el laboratorio, con dicloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) al 0,2% por 20 minutos (figura 4).



**Figura 4.** Yemas cultivadas *in vitro* de *A. perutilis* Hemsley. **A.** Contaminada **B.** Sana.

Para reducir los efectos que tiene el proceso de desinfección sobre el explante, se recomienda tener en cuenta: (1) reducir la duración del proceso de escisión y de esterilización del explante, y (2) sustituir el agente desinfectante. Esto se corrobora con la revisión de literatura, en la cual, Seneviratney (1996), con brotes de *Hevea brasiliensis* para su establecimiento *in vitro*, encontraron que la desinfección de los explantes con hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ), a diferentes concentraciones, promovió el oscurecimiento de los tejidos y la exudación de fenoles; por su parte, el uso de dicloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) como agente desinfectante provocó menos problemas de oscurecimiento en los tejidos. En *Strelitzia reginae*, el uso de  $\text{HgCl}_2$  al 0,3% fue menos lesivo que el hipoclorito de calcio al 9% (Ziv y Halevy 1983); igualmente fue el caso de *A. perutilis* Hemsley ya que con el cambio de desinfectante se logró tanto el control de la contaminación como una mayor sobrevivencia de los explantes durante el establecimiento *in vitro*.

## Conclusiones

El explante de yemas fue el que mejor se comportó en los distintos tratamientos aplicados.

Trasladar el material colectado en campo hasta el laboratorio en solución de Benlate 90% más yodo 10%, mejora el control de la contaminación.

El dicloruro de mercurio a una concentración de 0,2% por 20 minutos de inmersión arrojó la mayor efectividad en el control de la contaminación de hongos y bacterias endógenas y en la reducción de los efectos colaterales sobre los explantes de yemas de *A. perutilis* Hemsley.

## Referencias bibliográficas

- Alzate, C. N. 1987. La influencia del Guacharo (*Steatornis caripensis*) en la germinación de varias especies forestales y en la regeneración del comino (*Aniba perutilis* Hemsley) en la región de Río claro (Antioquia). (Tesis posgrado) Medellín. Universidad Nacional de Colombia, p 110.
- Bennett, L.K., and Davies, JR. F.T. 1986. *In vitro* Propagation of *Quercus shumardii* seedlings. *Hortscience*. 21(4):1045-1047.
- Bonferroni, C.E. 1936. Teoría estadística de la clase de calculo de la probabilidad. Instituto Superior de las ciencias economicas, comerciales y de finanzas. 3-62.
- Cárdenas L, D y Salinas, N . R. 2006. Libro rojo de plantas de Colombia. Especies maderables amenazadas. Bogotá D.C. Instituto Amazónico de Investigaciones SINCHI, Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial. p 169.
- Chalupa, V. 1990. Micropropagation of Hornbeam (*Carpinus betulus* L.) and Ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Biologia Plantarum*. 32(5):332-338.
- George, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture: The technology. Great Britain: exegetics Limited. Part 1. The Technology. 2 ed. Edington, UK: Exegetics Ltd. 1(2):574.
- Hernandez, Y.; y Gonzalez, M. E. 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*. 31(4): 00-00.
- Holdridge, L.R. 1978. Ecología basada en zonas de vida. San José, Costa Rica: Instituto de interamericano de Ciencias Agrícolas. p 216.
- Hurtado, A. C. A. 2007. Uso de modelos de predicción como herramienta para estimar el área de distribución potencial de la especie *Aniba perutilis* Hemsley (Comino Crespo) en el Departamento del Valle del Cauca. (Tesis de pregrado). Fundación Universitaria de Popayán, Facultad de ciencias naturales, Programa de ecología. Popayán, p 72.
- Materán M. E., Vega M. C., Sánchez-Olate M., Sáez K., Rodríguez R. y Ríos D. 2008. Reactivación de material vegetal élite de *Pinus radiata* d. Don. Mediante microinjerto *in vitro*. *Interciencia*. 33(1): 66-70.



- Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15:473-497.
- Obregon S. C. 2006. El comino crespo: Belleza 100% colombiana. En vía de extinción. Revista M&M. 15(51):14-19. Link: <http://www.revista-mm.com/ediciones/rev51/especie.pdf>
- Pedroza M.J.A. 2008. Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en condiciones *in vitro*. Bogotá, Colombia: Universidad Distrital Francisco José de Caldas, p 348.
- Purchit, S., Kukda, G., Sharma, P., and Tak, K. 1994. *In vitro* propagation of an adult tree *Wrightia tomentosa* through enhanced axillary branching. *Plant Science*. 103: 67-72.
- Ribas, L.L.F., Zanette, F., Kulchetscki, L., and Guerra, M.P. 2003. Estabelecimento de culturas assépticas de *Aspidosperma polyneuron*. *Ciência Florestal*. 13(1): 115-122.
- Santamaría, H. A. 2005. Recursos Biológicos Escuela de Ingeniería de Antioquia. Disponible en: <http://biologia.eia.edu.co/ecologia/estudiantes/comino.htm>
- Seneviratne, P., and Wijesekara, G. A. S. 1996. The problem of phenolic exudates in *in vitro* culture of mature *Hevea brasiliensis*. *Journal of Plantation Crop*. 24: 54-62.
- Shapiro, S. S. and Wilk. M. B. 1965. An analysis of variance test for normality (Complete Samples). Source: *Biometrika*. 52 (3/4), pp. 591-611. Published by: *Biometrika Trust Stable*. URL: <http://www.jstor.org/stable/2333709> Accessed: 03/02/2009 15:44
- Ziv, M., and Halevy, A. 1983. Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae*. *HortScience*. 18: 434-436.



## Comité evaluador

La Revista Colombiana de Biotecnología ofrece sus agradecimientos a los siguientes docentes quienes actuaron en el presente número como Comité de Arbitraje:

- Alonso Hurtado, Uriel, cMSc Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, uahurtadop@unal.edu.co
- Alvarez, Juan Carlos, PhD., Escuela de Ciencias Agropecuarias, Apatzingán, Michoacán, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México, jcalvarezh@yahoo.com.mx
- Aragón, Oscar, Ing., MSc, cPhD, Grupo de Bioprocesos y Bioprospección, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, oscarleo1@yahoo.com
- Arahana, Venancio, PhD., Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad San Francisco de Quito, Ecuador, varahana@usfq.edu.ec
- Argôlo Filho, Ronaldo Costa, PhD., Dept. Biological Science, State University of Santa Cruz, Brasil, ronaldoadargolo@yahoo.com.br
- Belaich, Mariano N, PhD., UGBCM-AVI, Instituto de Microbiología Básica y Aplicada, Departamento Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina, mbelaich@unq.edu.ar
- Bernal, Mauricio, MSc., cPhD Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, jmbernalmo@unal.edu.co
- Bonilla Morales, Miguel Macgavver, cMSc Biológicas, Docente asistente, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, mmbonillam@unal.edu.co
- Bottura Maccagnan, Douglas Henrique, PhD., Unidade Universitaria da UEG de Ipora, Universidade Estadual de Goiás , Brasil, douglashbm@gmail.com
- Buitrago Hurtado, Gustavo, IQ, MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, gbuitragoh@unal.edu.co
- Castiblanco Rodríguez, Ana Lucia, QF., cMSc Toxicología, Coordinadora Lab. Análisis Instrumental, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, alcastiblanco@unal.edu.co
- Castro-Nava, Sergio, PhD., División de Estudios de Postgrado, Centro Universitario Victoria, Universidad Autónoma de Tamaulipas, México, scastro@uat.edu.mx
- Cepeda, Martha Lucia, MSc., Corporacion CorpoGen, Colombia, martha.cepeda@corpogen.org
- Comba Gonzalez, Natalia Beatriz, MSc, cPhD Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, natalia.comba@gmail.com
- Corchete Sanchez, Purificación, PhD., Departamento Fisiología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, España, corchpu@usal.es
- Corredor, Gloria, MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, gacorredorh@unal.edu.co
- Cortazar Gómez, Jorge E, MSc, cPhD Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, iqicortazar@hotmail.com
- Cotes Torres, José Miguel, PhD., Departamento de Ciencias Agronómicas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Sede Medellín, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, jmcotes@unal.edu.co
- Cristiano Fajardo, Sergio Andrés, MSc , PhD en Ciencias Bioquímicas, Instituto de Biotecnología , Universidad Nacional Autónoma de México, México, sacristi@ibt.unam.mx
- Daquinta Gradaille, Marcos, PhD., Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba, mdaquinta@bioplasmas.cu
- de Oca Martínez, Nivian Montes, PhD., Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, CENPALAB, Cuba, nivian@censa.edu.cu
- de Sanjosé, Silvia, MD, PhD., IDIBELL, Institut Català d'Oncologia-Catalan Institute of Oncology, L'Hospitalet de Llobregat , España, s.sanjosé@iconcologia.net
- Decaro Junior, Sergio Tadeu, MSc., PhD., Agricultural Engineer, Depto. Fitossanidade, Universidad Estatal Paulista, UNESP, Brasil, sergiotdecaro@yahoo.com.br
- Delforno, Tiago Palladino, PhD., Laboratorio de Procesos Biológicos, Departamento de Hidráulica e Saneamiento, Escuela de Ingeniería de São Carlos, Universidad de São Paulo, Brasil, tiago.palladino@gmail.com
- Diangelo, Maria Esther, PhD., Jefe de Área de Inmunizaciones y Programas Nacionales, Ministerio de Salud, Argentina, vacunas@sanluis.gov.ar
- Fatta, Nora Alicia, PhD, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina, nfatta@agro.uba.ar
- Fernández Rodríguez, Ernesto, PhD., Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría, Cuba, erme@electric.cujae.edu.cu
- Fernandez-Lafuente, Roberto, PhD., Dept Biocatalisis, Campus UAM, Madrid 28049, Spain, CSIC, Inst Catalis, España, rrl@icp.csic.es
- Ferrari, Mario Daniel, PhD., Depto. Bioingeniería, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República, Uruguay, dferrari@ing.edu.uy
- Ferreira, Maria Luján, PhD., CONICET, Universidad Nacional del Sur, Argentina, mlferrera@plapiqui.edu.ar
- García Romero, Alejandro, BSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, lagr84@gmail.com
- García Romero, Ibbonne Aydee, PhD., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, ibonne@gmail.com
- Geizzecler, Tomazetto, PhD Genetics and Microorganisms, Institut fuer Genomforschung und Systembiologie, Universität Bielefeld, Alemania, geizetomazetto@uol.com.br
- Gil, José, PhD., Facultad de Ciencias Agrícola, Universidad de Aarhus, Dinamarca, Josef.Gil@agrsci.dk
- Gil, Jose Fernando, cPhD, Departamento de Agroecología, Aarhus University, Dinamarca, Josef.Gil@agrsci.dk
- González Sáyler, Sandra Milena, MSc. Microbiología, Lab de marcadores moleculares, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, milenasyer@gmail.com
- Guevara González, Ramón Gerardo, PhD., Ing. De Biosistemas, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, México, ramon.guevara@uaq.mx
- Guigou, Mairan, PhD., Depto. Bioingeniería, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República, Uruguay, mguigou@ing.edu.uy
- Hernández-Castañeda, Óscar Ibañ, PhD., Ingeniería Agronómica, Facultad de Ciencias Básicas e ingenierías, Universidad de los Llanos, Colombia, oscaribanhernandez.90@gmail.com
- Huamán Pino, Gabriela Alejandra, PhD., Depto de Ciencia de los Materiales y Metalurgia, Pontificia Universidad Católica de Rio de Janeiro, Brasil, gabriela@esp.puc-rio.br
- Jaramillo Lanchero, Ruben Dario, PhD IBB-Ciencias Biomédicas Bioquímica, Universidad de Sucre, Colombia, rubenjaramillo@hotmail.com
- Jáuregui, Damelis J., PhD., Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Central de Venezuela, Venezuela, jauregid@agr.ucv.ve
- Jesús Rafael Méndez-Natera, PhD., Departamento de Agronomía, Escuela de Ingeniería Agronómica, Universidad de Oriente, Venezuela, jmendezn@cantv.net
- Lambert García, Tania, MSc., Gestión Ambiental, Universidad de Granma, Cuba, tlambertg@udg.co.cu
- Lárez Velásquez, Cristóbal, PhD, Grupo de Polímeros, Departamento de Química, Universidad de Los Andes, Venezuela, clarez@ula.ve
- Lárez Velásquez, Cristóbal, PhD., Grupo de Polímeros, Universidad de los Andes, Venezuela, clarez@ula.ve
- Londoño Uribe, María Margarita, PhD., Facultad de Ciencias Agrarias, Politécnico Colombiano "Jaime Isaza Cadavid", Colombia, mmlondono@elpoli.edu.co
- Magnoli, Carina, PhD., Dpto. de Microbiología e Inmunología, Inv. Adjunto CONICET, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina, cmagnoli@exa.unrc.edu.ar
- Marín Montoya, Mauricio, PhD., Departamento de Biociencias, Facultad de Ciencias, Sede Medellín, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, mamarinm@unal.edu.co
- Marulanda Ángel, Marta Leonor, PhD., Docente Titular e Investigadora, Facultad de Ciencias Ambientales , Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia, ubioleve@utp.edu.co
- Mayz Figueroa, Juliana, PhD., Núcleo de Monagas Campos "Juanico", Laboratorio de Rizobiología, Universidad de Oriente, Venezuela, julianamayz@cantv.net
- Meneses Guzmán, Andrés Julián, cMSc., Universidad Nacional de Colombia, Colombia, juliann419@hotmail.com
- Montaña Lara, José Salvador, cPhD, Departamento de Microbiología, Centro Colombiano de Genómica y Bioinformática de Ambientes Extremos, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, jose.montana@javeriana.edu.co
- Montenegro Gómez , Sandra Patricia, PhD, Universidad Icesi, Colombia, sandrapmontenegro@hotmail.com
- Morales Nieto, Carlos Raul, MSc., Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua, México, morales\_nieto\_c\_r\_@hotmail.com
- Nava Pérez, Eusebio, PhD., Laboratorio de Bioinsecticidas, Depto de Biotecnología Agrícola, Instituto Politécnico Nacional, México, enavap@ipn.mx
- Onamu, Rose, PhD., Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, México, ronamu2003@yahoo.co.uk
- Ortiz-Quintero Blanca, PhD., Investigadora en Ciencias Médicas, Unidad de Investigación, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México, boq@iner.gob.mx
- Pala Martinelli, Paulo Roberto, MSc., PhD., Agricultural Engineer. Depto. Fitossanidade, Universidad Estatal Paulista, UNESP, Brasil, prpmartinelli@yahoo.com.br
- Pannia Espósito, Breno, PhD., Institute of Chemistry, Sao Paulo, Brasil, breno@iq.usp.br
- Parra Suescún, Jaime Eduardo, PhD., Depto de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Sede Medellín, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, jeparrasu@unal.edu.co
- Peraza A., Andrés, cMSc, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, andresp8503@gmail.com
- Pérez Almeida, Iris, PhD., INIA-CENIAP, Unidad de Biotecnología Agrícola, Venezuela, iperez@inia.gob.ve
- Pérez Mancilla, Ximena C., cPhD., MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, xcperezm@unal.edu.co
- Perez-Verdin, Gustavo, PhD., CIIDIR - DGO, Instituto Politécnico Nacional, México, guperezv@ipn.mx
- Pintos, María Eugenia, PhD., Inst. de genética veterinaria, Fac. de Ciencias veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, eugeniapintos@icv.unlp.edu.ar
- Ramírez, María Laura, PhD., Dpto. de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias exactas Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina, mramirez@exa.unrc.edu.ar
- Reguero Reza, María Teresa, MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, mtregueror@unal.edu.co
- Rivera Álvarez, Sonia, PhD, Directora de Posgrado, Universidad Finis Terrae, Chile, soniarivera27@hotmail.com
- Rivero González, Deyanira, MSc., Estación Experimental de Arroz Los Palacios, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Cuba, deyanira@inca.edu.cu
- Rodríguez Manzano, Arlene, PhD., Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humbolt" (INIFAT), Cuba, arlene@inifat.co.cu
- Romaní Pérez, Aloia, PhD., IBB-CEB, Institute for Biotechnology and Bioengineering-Centre of Biological Engineering, University of Minho, Portugal, aloia@ceb.uminho.pt
- Rosas García, Ninfa María, PhD., Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, México, nrosas@ipn.mx
- Ruiz A., Camilo, cMSc, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, caaruizav@unal.edu.co
- Sáenz Aponte, Adriana, MSc., Unidad de Ecología y Sistemática UNESIS. Departamento de Biología, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, adriana.saenz@javeriana.edu.co
- Sánchez, Jaime, PhD., Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Universidad de los Andes, Venezuela, jsaime@ula.ve
- Santos A. Oscar, MSc., cPhD, Universidad Federal de Viçosa, Brasil, santosamaya@gmail.com
- Sauka, Diego H., PhD., Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina, dsauka@cni.inta.gov.ar
- Sepúlveda Valencia, José Uriel, PhD., Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, josepul@unal.edu.co
- Sifontes, Ángela B, PhD, Centro de Química, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Venezuela, angelasifontes@gmail.com
- Solórzano Santos, Fortino, PhD., Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional SXII, Instituto Mexicano del Seguro Social, México, fortino.solorzano@imss.gob.mx
- Vaillant Flores, Daymara, PhD., Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, Cuba, dvallant@inisav.cu
- Valdez Balero, Apolonio, PhD., Prof. Inv. COLPOS, Campus Tabasco, COLPOS, México, licpo@yahoo.com.mx
- Valencia Chona, Jorge Andrés, MSc. Microbiología, Colciencias, Colombia, joavalenciach@unal.edu.co
- Valenzuela V., Carolina, PhD., Departamento de Fomento de la Producción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Chile, cvalenzuelav@u.uchile.cl
- Vargas A, Claudia M., MSc., Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia, cmvargas@unal.edu.co
- Varón Devia, Edgar Herney, PhD., CORPOICA, , Colombia, evaron@corpoica.org.co
- Vasconsuelo, Andrea, PhD., Lab. Química Biológica, Universidad Nacional Del Sur, Argentina, avascon@cnba.edu.ar
- Velázquez Del Valle, Miguel Gerardo, PhD., Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, México, mdelvall@ipn.mx
- Villavicencio G, Edith, PhD., Campo Experimental Saltillo CIRNE-INIFAP, México, villavicencio.edith@inifap.gob.mx

## Autores – Authors

### A

Acosta Cárdenas, Alejandro; MSc. Grupo de Biotransformación; Universidad de Antioquia; Colombia; aleacosta45@gmail.com

Acosta Días, Silvia; Lic. Microbiología, MSc. en Microbiología; Centro de Investigaciones del Petróleo; Cuba; sacosta@ceinpet.cupet.cu

Alfonso Montero, Antonio; MV; Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio. CENPALAB; Cuba; antonio.alfonso@cenpalab.inf.cu

Alonso Rojas, Ramón; MV., Fallecido; Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio. CENPALAB; Cuba

Ancizar Aristizabal, Fabio; Director Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional de Colombia; Colombia; faaristizabalg@unal.edu.co

Aragón Abreu, Carlos; Bioquímico e Ingeniero Químico, Investigadores, Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila; Ciego de Ávila; Cuba

Arana Labrada, Franklyn; MSc Biotecnología vegetal; Universidad de las Tunas “Vladimir Ilich Lenin”, Ave. Carlos J. Finlay s/n, Reparto Buenavista 75200 Israel Santos, Las Tunas; Cuba; franklynal@ult.edu.cu

Ariza Márquez, Yeimy Viviana; Bacterióloga y lab. clínica UCMC, cPhD biotecnología; Universidad Nacional de Colombia; Colombia; yvarizam@unal.edu.co

Arrieta Álvarez, Irma; Biólogos, grupo Bioprospección Agropecuaria; Universidad de Sucre; Colombia

Arrieta Álvarez, Yenis; Biólogos, grupo Bioprospección Agropecuaria; Universidad de Sucre; Colombia

Arteaga Márquez, Margarita; MSc. Departamento de Ingenierías; Universidad de Córdoba; Colombia

Arteaga Pérez, María Elena; MSc; Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio. CENPALAB; Cuba; melena@cenpalab.inf.cu

Atehortua Garcés, Lucía; PhD. Grupo de biotecnología Vegetal; Un. Antioquia; Colombia; latehor@gmail.com

Atehortua, Lucia; PhD. en Ciencias, Docente Instituto de Biología; Un. Antioquia (Medellín); Colombia; latehor@gmail.com

### B

Barbón, Raúl; Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas; Cuba; raulb@ibp.co.cu

Barrios San Martín, Yaima; Lic. Microbiología, MSc. en Microbiología; Centro de Investigaciones del Petróleo; Cuba; yy@ceinpet.cupet.cu

Beltrán López, Ángela Patricia; Bacterióloga y lab. clínica UCMC, cPhD biotecnología; Universidad Nacional de Colombia; Colombia; apbeltranl@unal.edu.co

Beltrán Pedroza, Diana Marcela; Msc. en Ciencias Biológicas, Investigadora grupo de Genética y Biotecnología de la Universidad del Tolima (GEBIUT); Universidad del Tolima (Ibagué); Colombia; dianamabelbiology@gmail.com

Bernau Gutierrez, Sebastian; cMsc en Ciencias Básicas Biomédicas, Facultad de ciencias, Universidad El Bosque. Biólogo; Colombia; gutierrezsebastian@unbosque.edu.co

Bessy Cutiño-Avila; Microbióloga, Profesora; Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana; Cuba; bvcutav.88@gmail.com

Briceño Balcázar, Ignacio; Profesor titular; Universidad Javeriana; Colombia; ibriceno@javeriana.edu.co

Buitrago Ramírez, Diana Marcela; PhD. Ciencias Farmacéuticas. Bacterióloga; Universidad El Bosque; Colombia; buitragodianam@unbosque.edu.co

### C

Cadavid -Restrepo, Gloria; Facultad de Ciencias. Grupo Microbiodiversidad y Bioprospección, Facultad de Ciencias; Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín; Colombia; gecadavi@unal.edu.co

Caicedo, Ana Milena; Ph.D. Grupo de Investigación en Diversidad Biológica; Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira; Colombia; anam.caicedo@gmail.com

Calzado Lamela, Orlindes; Licenciada en Química. Departamento de Química; Facultad de Ciencias Naturales (FCN), Universidad de Oriente (UO), Santiago de Cuba; Cuba; lamelat@cnt.uo.edu.cu

Capote Pérez, Alina; MSc Biotecnología vegetal; PhD Ciencias Agrícolas, Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Villa Clara; Cuba; alina@ibp.co.cu

Cardona Gallo, Santiago; Departamento de Geociencias y Medio Ambiente; Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín; Colombia; scardona@unal.edu.co

Cascaret Carmenaty, Dannis Adrián; MSc Biotecnología. Departamento de Química; Facultad de Ciencias Naturales (FCN),

Universidad de Oriente (UO), Santiago de Cuba; Cuba; dncascaret@cnt.uo.edu.cu

Castaño Peláez, Hader Ivan; MSc. Facultad de Administración; Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid; Colombia; hcastano954@gmail.com

Castillo Perdomo, Diana Marcela; cPhD Biotecnología, Facultad de ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Magister en Microbiología. Bacterióloga; Colombia; castillodiana@unbosque.edu.co

Chacón, Julie Giovanna; Microbióloga Industrial, Laboratorio de innovación e investigación en biotecnología agroambiental, Grupo Microbiota; Universidad de Santander; Colombia; juliechao@msn.com

Chaparro-Giraldo, Alejandro; I. Agrónomo, MSc, PhD. Grupo de Ingeniería Genética de Plantas, Depto de Biología, Instituto de Genética; Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá; Colombia; acahparrog@unal.edu.co

Chávez Planes, María de los Ángeles; Bioquímicos, Profesores, Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología; Universidad de La Habana; Cuba; mchavez@infomed.sld.cu

Chávez, Maité; Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas; Cuba; maite@ibp.co.cu

Correa, Elizabeth; Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias; Universidad Nacional de Colombia sede Medellín; Colombia

Cury Regino, Katia; MSc. Depto Ingeniería Agroindustrial; Universidad de Sucre; Colombia; katiacury@hotmail.com

### D

de Fera, Manuel; Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas; Cuba; mdeferia@ibp.co.cu

del Monte-Martínez, Alberto; Bioquímico, Profesor e Investigador, Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología; Universidad de La Habana; Cuba; adelmonte@fbio.uh.cu

Díaz Brito, Joaquín; Bioquímicos, Profesores, Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología; Universidad de La Habana; Cuba; jdiaz@infomed.sld.cu

Díaz, Imeray; Licenciada en Ciencias Farmacéuticas; Centro Nacional de Biopreparados; Cuba; imeray.diaz@biocen.cu

Durango Villadiego, Alba; Doctor en ciencia y tecnología de alimentos. Departamento de Ingenierías; Universidad de Córdoba; Colombia

## E

Emmanuel Vázquez, Alfredo; M. en I., Departamento de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Mazatlán; Mazatlán Sinaloa; México; alfredoemma@yahoo.com.mx  
Escobedo Lozano, Amada Yerén; PhD., Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Mazatlán, Mazatlán Sinaloa; México; amadayere@yahoo.com.mx  
Espinosa López, Georgina; Ingeniero Agrónomo, PhD en Ciencias Naturales, Profesor Titular; Universidad Nacional de Loja, Ciudadela "Guillermo Falconí Espinosa" sector La Argelia; Ecuador  
Esquivia Mercado, Mabel Beatriz; M.Sc. Grupo de Biotransformación; Universidad de Antioquia; Colombia; mbem19@gmail.com

## F

Fernández Marrero, Yuniel; Bioquímico, Investigador, Centro de Inmunología Molecular; La Habana; Cuba; yuniel@cim.sld.cu  
Florez, Alvaro M.; Lab Biología Molecular y Biotecnología, Facultad de Medicina; Universidad de Santander; Colombia; amflorez@udes.edu.co  
Forte Miranda, Cándida; MSc; Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio. CENPALAB; Cuba; candida.forte@cenpalab.inf.cu  
Francis Turner, Liliana; PhD; Universidad del Tolima; Colombia; lily\_colcuba@gmail.com

## G

Gil Pradas, Dayrom; Bioquímicos, Profesores; Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana; Cuba; dayromgil@gmail.com  
González Hernández, Francisca; Técnico en Química Industrial; Centro de Investigaciones del Petróleo; Cuba; francis@ceinpet.cupet.cu  
González Navarro, Bárbara O; PhD. Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio. CENPALAB; Cuba; barbara.gonzalez@cenpalab.inf.cu  
Gonzalez, Adriana; Lab Biología Molecular y Biotecnología, Facultad de Medicina; Universidad de Santander; Colombia  
Gualtero Escobar, Diego Fernando; cPhD en Biotecnología. Facultad de ciencias, Universidad Nacional de Colombia. MSc Bioquímica. Lic. Biología y Química; Colombia; gualterodiego@unbosque.edu.co  
Guerra S, Beatriz Elena; cPhD Laboratorio de innovación e investigación en biotecnología agroambiental, Grupo Microbiota; Universidad de Santander; Colombia; bguerra@udes.edu.co  
Guerrero Porras, Liliana; Facultad de Ciencias. Grupo de Microbiodiversidad y Bioprospección, Facultad de Ciencias; Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín; Colombia; lguerre@unal.edu.co  
Guisán Seijas, José Manuel; Ingeniero Químico, Profesor e Investigador; Instituto de Catálisis y Petroleoquímica CSIC, Canto Blanco, 28049, Madrid; España; jmguisan@icp.csic.es  
Guzmán-Barney M. Mónica; Bióloga, MSc., PhD. Laboratorio de Virus Vegetales, Instituto de Biotecnología (IBUN); Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá; Colombia; mmguzmanb@unal.edu.co

## H

Hayes García, Ranyer; Ing. en Química; Centro de Investigaciones del Petróleo; Cuba; ranyer@ceinpet.cupet.cu  
Hernández de la Torre, Martha; Bioquímico e Ingeniero Químico, Investigadores, Centro de Bioplantas; Universidad de Ciego de Ávila; Cuba; mhermandez@bioplantascu  
Hernández-Guzmán Angie Katherine; Bióloga, MSc. Laboratorio de Virus Vegetales, Instituto de Biotecnología (IBUN); Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá; Colombia  
Hidalgo, Luis Carlos; Ingeniero Químico; Centro Nacional de Biopreparados; Cuba; lchidalgo@biocen.cu  
Hincapié Rojas, Viviana Patricia; Licenciada en Biología, MSc. Biociencias y Derecho, Grupo de Ingeniería Genética de Plantas, Departamento de Biología, Instituto de Genética; Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá; Colombia; vphincapié@unal.edu.co

Jetten, Mike; Department of Microbiology, Institute for Water and Wetland Research; Radboud University Nijmegen; Netherlands  
Jiménez González, Elio; Doctor en Ciencias Agrícolas; University of Florida, Tropical Research & Education Center Institute of Food & Agricultural Sciences; Estados Unidos; eliojimenez@ufl.edu  
Jiménez-Tello, Marco V.; Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; Cuba; jr350ec@yahoo.es  
**I**  
La O, Mariana; Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; Cuba; mariana@ibp.co.cu  
Lafaurie Villamil, Gloria Ines; Directora Instituto UIBO. MSc Epidemiología. Periodoncista. Odontóloga; Universidad El Bosque; Colombia; investigaciones.odontologia@unbosque.edu.co  
Luján Rhenals, Deivis; PhD ciencia de los alimentos. Departamento de Ingeniería; Universidad de Córdoba; Colombia  
**M**  
Martínez Flórez, Guillermo; PhD Estadística. Departamento de Matemáticas y Estadística; Universidad de Córdoba; Colombia  
Martínez Sánchez, Heimy Franceline; M.C., Departamento de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Mazatlán; Mazatlán Sinaloa; México; heimy\_france@hotmail.com  
Mejía Gómez, Carlos Eduardo; MSc. Grupo de Biotransformación; Universidad de Antioquia; Colombia; mcmeng@udea.edu.co  
Méndez-Gómez, Evaristo; PhD., Departamento de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Mazatlán; Mazatlán Sinaloa, México; evaristo3@hotmail.com  
Mesa López, Neftalí; MSc Dirección Universitaria. Director grupo de Genética y Biotecnología de la Universidad del Tolima (GEBIUT), Docente Facultad de Ciencias; Universidad del Tolima; Colombia; nmesa@ut.edu.co  
Milán-García, Yoamel; Lic Bioquímica, MSc Bioquímica; Facultad de Biología, Universidad de la Habana; Cuba; yoamel@fbio.uh.cu  
Mollineda, Angel; Centro de Investigaciones Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; Villa Clara; Cuba  
Morales Astudillo, Ángel Rafael; Ingeniero Agrónomo; Universidad Nacional de Loja, Ciudadela "Guillermo Falconí Espinosa" sector La Argelia; Ecuador; amoralesastudillo@yahoo.es  
Morales Palacio, María Natalia; Ingeniera Agrónoma, Magister en Biotecnología, Centro de Biotecnología; Universidad Nacional de Loja, Ciudadela "Guillermo Falconí Espinosa" sector La Argelia; Ecuador; nataliamorales88@yahoo.es  
Muñoz F, Jaime Eduardo; PhD. Grupo de Investigación en Diversidad Biológica; Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira; Colombia; jemunozf@palmira.unal.edu.co  
**N**  
Naranjo, Esther J.; MSc, Instituto de Biología; Universidad de Antioquia (Medellín); Colombia; enaranjo@matematicas.udea.edu.co  
**O**  
Orduz, Sergio; PhD Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias; Universidad Nacional de Colombia sede Medellín; Colombia  
Osuna Lizárraga, Anahí Elizabeth; MC., Depto Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Mazatlán, Mazatlán Sinaloa; México; naniely15@hotmail.com  
**P**  
Pedroza, Carmen J.; Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias; Universidad Nacional de Colombia sede Medellín; Colombia  
Pérez Cordero, Alexander; Ingeniero Agrónomo, MSc y P.hD en Microbiología, Grupo Bioprospección Agropecuaria; Universidad de Sucre; Colombia; alexpcor@unisucree.edu.co  
Pérez Pérez, Anabel; Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; Villa Clara; Cuba; anabel@ibp.co.cu

Pérez Silva, Rosa María; PhD Ciencias Químicas. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI); Facultad de Ciencias Naturales (FCN); Universidad de Oriente (UO), Santiago de Cuba; Cuba; rmaria@cebi.uo.edu.cu  
Pérez, Marta; Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; Cuba; martha@ibp.co.cu  
Pérez-Alonso, Naivy Lisbet; PhD Ciencias Agrícolas, Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Villa Clara; Cuba; naivy@ibp.co.cu  
Porras Gaviria, Jeimy Paola; Lic. Química; Unidad de Investigación Básica Oral (UIBO)-Laboratorio de biotecnología-División de Investigaciones-Facultad de Odontología-Universidad El Bosque; Colombia; porrasyeimi@unbosque.edu.co  
**Q**  
Quiala, Elisa; Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; Cuba; elisa@ibp.co.cu  
Quintero, Irma R.; MSc. Universidad del Magdalena; Santa Marta; Colombia  
Quintero-Rendón, Luz; Departamento de Geociencias y Medio Ambiente; Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín; Colombia; laquinte@unal.edu.co  
**R**  
Riera Ojeda, Layna; PhD; Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio. CENPALAB; Cuba; layna.riera@cenpalab.inf.cu  
Rodríguez Carrascal, Andrés; Biólogos, grupo Bioprospección Agropecuarias; Universidad de Sucre; Colombia  
Rodríguez Ruiz, Johana; Química Farmacéutica, MSc en Química; Universidad de Cartagena; Colombia  
Rojas Sierra, Johanna; Biología, MSc Microbiología, Grupo Bioprospección Agropecuaria; Universidad de Sucre; Colombia; rojas\_johanna@yahoo.com  
Rueda, Nohora J.; Lab Biología Molecular y Biotecnología, Facultad de Medicina; Universidad de Santander; Colombia  
**S**  
Salas Sarduy, Emir; Bioquímicos, Profesores, Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología; Universidad de La Habana; Cuba; emirsalas@gmail.com  
Sanabria, Janeth; Laboratorio de Microbiología Ambiental, Escuela de Ingeniería Sanitaria y Ambiental; Universidad del Valle; Colombia  
Sánchez Masache, Byron Rafael; Ingeniero Agrónomo; Universidad Nacional de Loja, Ciudadela "Guillermo Falconí Espinosa" sector La Argelia; Ecuador  
Sanchez, Jaime; Depto hidráulica y sanitaria, Universidad de los Andes; Venezuela  
Serna, Elizabeth; Fac Ciencias. Grupo de Microbiodiversidad y Bioprospección, Facultad de Ciencias; Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín; Colombia; esernao@unalmed.edu.co  
Sol Hernández, Manuel de Jesús; M.C., Depto de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Mazatlán, Mazatlán Sinaloa; México; solhema@hotmail.com  
Sosa, Rafael; Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; Villa Clara; Cuba  
Suárez, Isidro E.; Universidad de Córdoba, Depto de Ingeniería Agronómica y Desarrollo Rural; Montería; Colombia; isuarez@sinu.unicordoba.edu.co  
Suárez, Camilo; Depto Geociencias y Medio Ambiente; Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín; Colombia; casuarezmendez@unal.edu.co  
**T**  
Tur Naranjo, Eniey; Lic Biología. Depto de Biología; Facultad de Ciencias Naturales (FCN), Universidad de Oriente (UO), Santiago de Cuba; Cuba; etur@cnt.uo.edu.cu  
**U**  
Urrea, Aura I.; PhD. en Ciencias, Docente Instituto de Biología; Universidad de Antioquia (Medellín); Colombia; aurrea@matematicas.udea.edu.co  
**V**  
Villegas, Maikel; Lic Biología; Centro Nacional de Biopreparados; Cuba; villegas@biocen.cu



# 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: Cenicafe, 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 Editor

ial. 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

# 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 arti-

cle 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. Chin-chin, 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



REVISTA COLOMBIANA DE  
**BIOTECNOLOGÍA**

**TARJETA DE SUSCRIPCIÓN**

Suscribase  
hoy mismo

Nombre: \_\_\_\_\_ Apellidos: \_\_\_\_\_

Compañía: \_\_\_\_\_

Cargo: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Ciudad: \_\_\_\_\_ Estado/Dpto.: \_\_\_\_\_

País: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Fax: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

**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).

**472**

LA RED POSTAL DE COLOMBIA

www.4-72.com.co

➤ Línea de Atención al Cliente Nacional 01 8000 111210 ◀

