

ISSN 1688-6593 [en línea]

Número 12  
Agosto - diciembre 2016

# INNOTEC

REVISTA DEL LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY





# **INNOTEC**

REVISTA DEL LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY

## INNOTEC ISSN 1688-6593 [en línea]

es una revista científica arbitrada editada por el Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

### Equipo editorial

#### Dirección

Dr. Jorge Silveira,  
Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

#### Consejo editorial

MBA. Ing. Mariela De Giuda,  
Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU),  
Gerencia de Tecnología y Gestión, Uruguay

Dr. Andrés Dieste,  
Universidad de la República (UdelaR),  
Facultad de Ingeniería, Instituto de Ingeniería Química, Uruguay

Dr. Gustavo Domínguez,  
Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU),  
Gerencia de Investigación, Desarrollo e Innovación, Uruguay

Dra. Gabriela Eguren,  
Universidad de la República (UdelaR),  
Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología  
y Ciencias Ambientales, Uruguay

Dr. Tomás López,  
Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Química,  
Departamento de Alimentos, Uruguay

Dra. Laura Moya Silva,  
Universidad ORT Uruguay, Facultad de Arquitectura, Uruguay

MSc. Daniel Volpe,  
Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU),  
Gerencia de Análisis, Ensayo y Metrología, Uruguay

Dr. Federico Harte,  
Penn State University, Department of Food Science, Estados Unidos

Dr. Néstor Mazzeo,  
Universidad de la República (UdelaR), CURE, Maldonado, Uruguay

#### Edición

Lic. Marina Barrientos,  
Edición revistas INNOTEC, Centro de Información Técnica, Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

#### Administración de OJS y soporte técnico

Lic. Lorena Fiori,  
Centro de Información Técnica,  
Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

#### Diseño

Manosanta Desarrollo Editorial  
<http://manosanta.com.uy>

## Acerca de INNOTEC

INNOTEC es una revista científica arbitrada en modalidad doble ciego, editada anualmente en Montevideo, Uruguay, por el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) por medio de su Centro de Información Técnica, en formato digital en Open Journal Systems (<http://ojs.latu.org.uy>).

La transferencia de conocimiento y el intercambio con la comunidad son objetivos prioritarios de nuestra publicación, que reúne trabajos originales con un enfoque de rigor y calidad teórica y metodológica con el fin de contribuir a la producción sistemática de nuevo conocimiento científico tecnológico.

La revista está dirigida a investigadores, académicos, tecnólogos y estudiantes vinculados a los campos temáticos que aborda y que se corresponden a las áreas estratégicas de investigación del LATU y del país.

INNOTEC se encuentra indexada en las siguientes bases de datos: Latindex, Google Académico, Fuente Académica Premier de EBSCOhost y DOAJ.



La colección completa se puede consultar en línea en <http://ojs.latu.org.uy/index.php/INNOTEC/index>

La versión digital se distribuye bajo la modalidad de acceso abierto y los derechos autorales son protegidos por Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial 3.0 Unported.

Los conceptos y opiniones vertidos en los artículos publicados y el uso que otros puedan hacer de ellos son de responsabilidad de sus autores.

## INNOTEC - NÚMERO 12 - Agosto a diciembre 2016

ISSN electrónico: 1688-6593  
Título clave: INNOTEC (En línea)  
Título clave abreviado: Innotec (En línea)

Centro de Información Técnica, LATU  
Av. Italia 6201. Tel. (598) 2601 3724, ints. 1314 y 1350  
[ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy)  
<http://www.latu.org.uy>  
<http://ojs.latu.org.uy>

## Política editorial LATU

La actividad editorial del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) tiene como finalidad la difusión en la comunidad académica y profesional uruguaya de las investigaciones que apoyen el desarrollo de tecnologías y modelos de gestión que aporten valor a los procesos de innovación.

## Misión

Nuestra misión es la publicación de trabajos originales, con un enfoque de rigor y calidad teórica y metodológica, que contribuyan a la producción sistemática de nuevo conocimiento científico tecnológico y al fortalecimiento de la presencia uruguaya en redes regionales e internacionales. Es de interés del LATU consolidar el campo de la documentación científica a nivel local mediante la creación e innovación de productos editoriales.

## Los objetivos específicos son:

- Promover la publicación de investigaciones de excelencia en las áreas de conocimiento estratégicas del LATU, alineadas a su misión como impulsor del desarrollo sustentable del país y su inserción internacional a través de la innovación.
- Posicionar a los autores, técnicos y colaboradores en las plataformas electrónicas internacionales, estimulando su participación en el marco de un proceso de edición arbitrado por especialistas.
- Contribuir al desarrollo y transferencia de tecnologías de innovación orientadas a la mejora de procesos industriales, empresariales y sociales.
- Aportar y divulgar conocimiento científico de calidad a los técnicos, académicos, investigadores y a la sociedad en su conjunto, tanto para la efectiva transmisión de las experiencias como para el crecimiento profesional.
- Facilitar el intercambio y la creación de nuevo conocimiento entre instituciones.

Invitamos a los autores interesados en publicar en INNOTEC a ingresar a nuestra página en la plataforma Open Journal Systems (<http://ojs.latu.org.uy>) o a contactarse con el Centro de Información Técnica del LATU a través del correo electrónico [ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy) para recibir instrucciones para el envío de artículos a nuestro proyecto editorial.

# SUMARIO

Instrucciones a los autores . . . . .	4
Índice de autores. . . . .	63
Índice temático. . . . .	65

## ARTÍCULOS

- 7 Efecto del mínimo procesamiento y tratamiento con yerba mate sobre el potencial saludable y los atributos de calidad de manzanas Granny Smith**  
*Rodríguez Arzuaga, Mariana; Salsi, María Sara; Piagentini, Andrea Marcela.*
  - 15 *Lactococcus lactis* autóctono: evaluación del efecto antilisterial y de propiedades sensoriales en quesos tipo Cuartirolo**  
*González Revello, Álvaro; Carro, Silvana; Cal, Karina; Giacaman, Sheila; Aldrovandi, Ariel.*
  - 27 Selección de Basidiomicetes nativos con capacidad de degradar xenobióticos usando el endosulfán como modelo**  
*Rivero Machado, Anisleidy; Niell, Silvina; Heinzen, Horacio; Cesio, María Verónica; Cerdeiras, María Pía; Soubes, Matilde.*
  - 34 Implementación de métodos moleculares y microscópicos para estudios clínicos y ambientales relativos a *Cryptosporidium sp.* en Uruguay**  
*Rey, Fabiana; Acosta, Silvina; Martínez, Wilner; Lena, Anaydé; Tort, Cecilia; Acuña, Ana; Míguez, Diana; Ureta, Alejandro.*
  - 48 Evaluación in vitro del efecto tóxico de una formulación comercial de glifosato de amonio sobre cinco especies representativas de diferentes hábitats y niveles tróficos**  
*Spósito, Martín; Espínola Moltedo, Julio Cesar.*
- ## REVISIÓN
- 51 Tecnologías de control de floraciones de cianobacterias y algas nocivas en cuerpos de agua, con énfasis en el uso de irradiación por ultrasonido**  
*Míguez, Diana.*

# Instrucciones a los autores para publicar en INNOTEC

## Ámbito de los artículos y proceso de revisión

INNOTEC publica artículos originales inéditos en campos temáticos que responden a las áreas estratégicas de investigación del LATU y del país.

Esta publicación anual recopila las investigaciones realizadas por técnicos del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) y equipos de investigación de otras instituciones en el marco de proyectos y procesos de transferencia de conocimiento para el desarrollo de sistemas innovadores, productivos y de investigación.

Las publicaciones editadas por el Centro de Información Técnica son gestionadas en Open Journal Systems, software para la gestión del proceso editorial, desarrollado, soportado y libremente distribuido por el Public Knowledge Project bajo licencia pública general GNU.

El proceso de envío de artículos para la revista incluye los siguientes pasos:

- (a) Ingreso por parte del autor del artículo completo en el sistema utilizado por el Centro de Información Técnica para la edición de sus publicaciones en la web: <http://ojs.latu.org.uy>.
- (b) Por medio del sistema se notifica al autor la recepción del artículo y su eventual publicación. En este paso se consideran la originalidad del trabajo y se priorizan aquellos de áreas estratégicas y temáticas nacionales.
- (c) Una vez aprobado por el Consejo editorial de la revista, el artículo es enviado a proceso de arbitraje.
- (d) Se asignan los árbitros, quienes evaluarán el desarrollo específico del manuscrito, tanto en sus aspectos temáticos como metodológicos.
- (e) Devuelto el informe de arbitraje, el editor se comunica con el/los autor/es en respuesta de los comentarios que hace el evaluador del artículo. En caso de ser necesario habrá otras rondas de evaluación.
- (f) Se edita el artículo aplicando en el texto las normas del Manual de estilo del LATU y se envía la última versión diseñada al/los autor/es para su aprobación final.

Para poder incluir artículos completos, se debe considerar que estos no tengan derechos de autor otorgados a terceros a la fecha de envío y que no se hayan presentado a otras publicaciones simultáneamente.

Los artículos son publicados online. La versión digital se distribuye bajo la modalidad de acceso abierto y los derechos autorales son protegidos por Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial 3.0 Unported. Al ingresar al sistema <http://ojs.latu.org.uy> los autores deberán aceptar la Nota de copyright en la que se asumen los términos de responsabilidad, se reconoce la licencia CC y se establece el compromiso

a realizar la cita completa de la edición institucional de esta primera publicación del artículo en sus siguientes publicaciones –completas o parciales– efectuadas en cualquier otro medio de divulgación, impreso o electrónico.

Los conceptos y opiniones vertidos en los artículos publicados y el uso que otros puedan hacer de ellos son de responsabilidad de sus autores. Esta responsabilidad se asume con la sola publicación del artículo enviado. El LATU se reserva el derecho de publicar aquellos artículos que responden a las áreas previstas por la organización y su Consejo editorial para cada edición y de realizar modificaciones que favorezcan la óptima presentación de los artículos en la revista.

## Proceso de revisión

El arbitraje de esta revista se realiza por pares y bajo modalidad doble ciego, por lo que autores y árbitros permanecen anónimos a lo largo de todo el proceso.

El arbitraje es el proceso de evaluación crítica especializada de un manuscrito por parte de pares idóneos que operan en el área temática que dicho texto desarrolla y que no forman parte del staff editorial. Los comentarios y recomendaciones de los árbitros son un insumo determinante para la aceptación o rechazo de un manuscrito en el proceso editorial de publicaciones técnicas del LATU. No obstante, el equipo editor es responsable de la decisión final de publicación o rechazo de un artículo y de la notificación al autor de contacto.

El comité técnico de arbitraje de INNOTEC es un cuerpo de especialistas técnicos seleccionados por su grado de especialización, prestigio académico y experiencia profesional y editorial. Nuestros árbitros cumplen la vital función de evaluar el desarrollo específico del contenido de las publicaciones, tanto en sus aspectos temáticos como metodológicos, guiados por un formulario de revisión que es presentado a los autores del artículo.

Los autores cuentan con un plazo de siete días para la devolución del artículo corregido según las recomendaciones de los árbitros.

## Normas de presentación y envío de los textos

Para que el artículo sea considerado para su publicación, debe cumplir con las siguientes normas de presentación. Ante cualquier consulta diríjase al correo electrónico de referencia [ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy).

Para el correcto envío de su artículo, siga las instrucciones que se indican en OJS. Recuerde completar todos los datos del artículo, entre ellos: título, autores, filiación, resumen y palabras clave.

Nota: Los nombres completos de los autores deberán ser incluidos en los metadatos en la forma en la que se solicitan en OJS pero omitidos en el documento Word del artículo, primera medida para asegurar la integridad de la revisión ciega.

## Definiciones:

**Autor.** Persona o colectividad responsable del contenido intelectual del documento.

**Título.** Refleja el contenido del texto con precisión, es neutro e informativo.

**Resumen.** Provee información específica. Sintetiza, anuncia y jerarquiza contenidos.

**Introducción.** Incluye antecedentes concretos y datos del proceso, enumeración de objetivos e importancia del tema.

**Materiales y Métodos.** Relato de los métodos y procedimientos que permitieron obtener los resultados presentados. Obtención del material, condiciones y metodología. Análisis estadísticos, programas.

**Resultados.** Presentación y expresión de los hallazgos en tablas, gráficos y/o figuras.

**Discusión y Conclusiones.** Síntesis de los avances y las contribuciones más relevantes de la investigación. En esta sección se discuten los resultados en el orden en el que fueron presentados. Asimismo, se define y diferencia claramente el aporte del trabajo en relación al conocimiento previo. Si procede, se mencionan posibles líneas futuras de investigación y de aplicación de los resultados.

**Reconocimientos.** Breve agradecimiento a quienes colaboraron en la producción del artículo y/o que permitieron el desarrollo de la investigación.

**Referencias.** Referencias al material bibliográfico consultado para la elaboración del artículo.

## Los artículos deben presentar:

**Título** del artículo en mayúsculas y minúsculas, en inglés y español.

**Nombre completo de todos los autores (solo en metadatos de OJS)**, ingresados en orden decreciente según el grado de responsabilidad en el desarrollo del artículo, sin que medien jerarquías funcionales. Indicar la sección o departamento al que pertenecen y empresa de la que forman parte. Se debe señalar además el autor de contacto para las comunicaciones electrónicas subsiguientes.

**Resumen** en inglés y español, de 200 palabras máximo en su versión castellana.

**Palabras clave**, de dos a cinco, las cuales no deben repetir los términos ya utilizados en el título.

**Texto** de tres (3) a veinticinco (25) páginas de desarrollo (introducción, métodos, descripción de equipos, descripción de programas, desarrollo de teorías, resultados y discusión, conclusiones, referencias, tablas, figuras, gráficos e imágenes, (ver sección *Estilo y formato de citas y referencias* en este documento). El texto deberá ser presentado en fuente Arial 11, a espacio doble y con numeración de líneas, con títulos en mayúsculas y minúsculas y en formato .doc, de cualquier versión de Microsoft Word.

**Secciones.** Los títulos de sección (que señalan Introducción, Materiales y Métodos, Discusión, etc.) deben ser

escritos en mayúscula y minúsculas, estilo de fuente bold y centrados en el texto. Los subtítulos serán justificados a la izquierda, escritos en mayúscula y minúsculas, también en bold. Tanto la primera letra del título y la primera letra de los nombres propios deben ser escritas en mayúscula. Se debe dejar un espacio entre líneas antes y después de cada subtítulo.

**Fórmulas, figuras, tablas y gráficos.** Las figuras deben numerarse correlativamente en orden de aparición en el texto, y deben incluir un breve título explicativo en el margen inferior a las mismas. Si es necesario incluir fotos o imágenes, estas se deben designar como figuras, deben ser nítidas y enviadas en formato jpg (mínimo 300 ppp aseguran una buena calidad de visualización). Las tablas deben ser numeradas correlativamente y en forma independiente de las figuras, y cada entrada debe ocupar su propia celda. Las mismas se numeran según el orden de aparición en el texto, incluyendo un título explicativo en la parte inferior de la tabla. Evite utilizar líneas verticales, incluir más de dos tablas por carilla y dividir tablas en más de un folio o en forma perpendicular al texto. Recuerde que el texto presenta las tablas, no desarrolla su contenido, estas deben explicarse en sí mismas.

**Además de estar insertadas en el artículo, cada figura, gráfico y tabla debe ser remitida en su propio archivo como fichero complementario en OJS**, con la referencia numérica correspondiente. Los números y símbolos empleados no deben ser menores al tamaño usado en el resto del texto (Arial 11).

Por favor, evite las notas al pie en el desarrollo del artículo. Denominaciones en latín: Deben ir en cursiva.

## Estilo y formato de citas y referencias

### Ejemplos usuales de citas

*Registro de citas textuales*

(López, 1985, p.93)

(González y Rubio, 1990, pp.110-111)

(Johnson, et al., 1970, pp.25-26)

*Para más de una obra del mismo autor y año en citas textuales*

(Alonso, 1988a, p.126-128)

(Alonso, 1988b, p.84)

*Registro de cita ideológica o paráfrasis*

Amor (2000) analiza los motivos para comenzar un negocio en línea...

Si el motivo para comenzar un negocio en línea es sólo para imitar a la competencia, se puede considerar que dicha razón no es la estrategia adecuada (Amor, 2000).

(Pérez y González, 2005)

(Rodríguez, et al., 2011).

(Pérez, 2014a)

(Pérez, 2014b)

### Ejemplos usuales de referencias

#### Monografías (libros)

Apellidos(s), Nombre o Inicial, año de edición. Título del libro en cursiva. N° de edición. Lugar de edición: editorial.

---

(Serie; Nº). ISBN (Este último si se posee)  
Bobbio, Norberto, 1958. *Autobiografía*. Madrid: Taurus.  
ISBN: 84-306-0267-4.

Newman, R., Walter, C., 2008. *Barley for food and health: science, technology, and products*. Nueva York: John Wiley & Sons

#### **Revistas como un todo**

*Título de la publicación en cursiva*. Responsabilidad. Edición. Identificación del fascículo. Lugar de edición: editorial, fecha del primer volumen-fecha del último volumen. ISSN

*Boletín Económico*. Banco de España. 1998, (1). Madrid: Banco de España, Servicio de Publicaciones, 1979-. ISSN: 0210-3737

#### **Artículos de revistas**

Apellido(s), Nombre o Inicial, año. Título del artículo. En: *Título de la publicación seriada*, Volumen(Número), páginas.

Llosa, J., Smith, M., Moore, A. y Cave, K., 1998. Modulo scheduling with reduced register pressure. En: *IEEE Transactions on computers*, 47(6), pp.625-638.

Álvarez, Begoña, Ballina, F. Javier de la y Vázquez, Rodolfo, 2000. La reacción del consumidor ante las promociones. En: *MK Marketing + Ventas*, (143), pp.33-37.

#### **Normas**

Entidad responsable de la norma (País de la entidad), año de publicación. No. o código de la norma: Título. Lugar de publicación: editorial abreviada.

Asociación Española de Normalización y Certificación (España), 2010. UNE 166000 EX, UNE 166001 EX, UNE 166002 EX: *Gestión de la I+D+I*. Madrid: AENOR.

Instituto Uruguayo de Normas Técnicas (Uruguay), 2000. UNIT-ISO 9001: *Sistemas de gestión de calidad - requisitos*. Montevideo: UNIT.

#### **Textos electrónicos, bases de datos y programas informáticos**

Responsabilidad principal, año. *Título* [tipo de soporte]. Edición. Lugar de publicación: editor, [fecha de consulta]. Descripción física. (Colección). Notas. Disponibilidad y acceso. Número normalizado

Rapp, A. O., Augusta, U. y Peek, R. D., 2001 *Facts and ideas of testing wood durability above ground* [En línea]. Hamburgo: BFH. [Consulta: 25 de setiembre de 2008]. Disponible en: <http://www.bfafh.de/inst4/43/pdf/3doublay.pdf>

#### **Patentes**

Mención de responsabilidad principal, Año de publicación del documento. *Denominación del elemento patentado*. Identificador del documento (país u oficina que lo registra). Clase internacional de documento de patente. Número.

Green, Daniel R., 2008. *Cereal flake with topical pieces*. United State Patent. 0101. D572,427.

Crosa, M. J., Harispe, R., Repiso, L., Silvera, C. y Wurtz, P, 2009. *Sistema que acelera el ingreso de solutos en alimentos porosos*. Uruguay. Dirección Nacional de la Propiedad Industrial. 31620.



# Efecto del mínimo procesamiento y tratamiento con yerba mate sobre el potencial saludable y los atributos de calidad de manzanas Granny Smith

## Effect of minimal processing and treatment with *yerba mate* on healthy potential and quality attributes of Granny Smith apples

Rodríguez Arzuaga, Mariana (1-2), Salsi, María Sara (2), Piagentini, Andrea Marcela (2)

(1) Departamento de Análisis de productos agropecuarios, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU

(2) Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Contacto: marodrig@latu.org.uy

RECIBIDO: 12/8/2016 – APROBADO: 25/11/2016

### Resumen

Se estudió el efecto del mínimo procesamiento solo y con tratamiento con ácidos cítrico y ascórbico e infusión de yerba mate, sobre las características fisicoquímicas, bioactivas, microbiológicas y sensoriales de manzanas Granny Smith. El mínimo procesamiento (sin tratamiento químico) produjo un descenso en el contenido de sólidos solubles y compuestos polifenólicos, en el recuento de aerobios mesófilos totales y en los atributos sensoriales gusto ácido y pardeamiento, y una mejora en la apariencia general evaluada sensorialmente. Comparando los resultados obtenidos para las manzanas mínimamente procesadas tratadas químicamente y sin tratar (control), se observó que el tratamiento químico aplicado produjo una disminución del sabor característico de las manzanas y un incremento en el gusto ácido y olores y sabores extraños. Sin embargo, el tratamiento aplicado fue efectivo en controlar el desarrollo de pardeamiento (aumento de  $L^*$  y mejora de la apariencia general sensorial y disminución de  $a^*$  y del pardeamiento evaluado sensorialmente) y en aumentar el potencial saludable (mayor contenido de polifenoles y vitamina C y mayor capacidad antioxidante), manteniendo recuentos microbiológicos similares a los encontrados en la materia prima.

**Palabras clave:** Frutas frescas cortadas, capacidad antioxidante, color.

### Abstract

The effect of the minimal processing with and without treatment with citric and ascorbic acids and *yerba mate* on the physicochemical, bioactive, microbiological and sensory characteristics of Granny Smith apples was studied. Soluble solids and polyphenol contents, total aerobic mesophilic microorganism counts, sour taste and the browning sensory attribute were reduced by the minimal processing (without chemical treatment), while the sensory general appearance improved. When comparing the results obtained for the treated and untreated (control) fresh-cut apples, it was observed that the applied chemical treatment reduced the characteristic flavor of the apples and increased sour taste, off-flavors and off-odors. However, the treatment was effective in controlling the browning development ( $L^*$  increased, sensory general appearance improved and  $a^*$  and sensory attribute browning decreased), in increasing the healthy potential (higher polyphenol and vitamin C content and antioxidant capacity), and maintaining the microbial counts similar to those obtained for raw material.

**Keywords:** Fresh-cut fruits, antioxidant capacity, color.

## Introducción

Las frutas y hortalizas frescas son componentes esenciales de la dieta humana y existe evidencia considerable de los beneficios nutricionales y para la salud asociados a su consumo, debido a su contenido en vitaminas, minerales, fibras y compuestos biológicamente activos (Cano, et al., 2005; Alegre, et al., 2011). La introducción en el mercado de frutas y hortalizas mínimamente procesadas es una herramienta de gran importancia para facilitar la incorporación de estos alimentos en la dieta del consumidor.

Cada una de las etapas de elaboración de frutas y hortalizas frescas cortadas puede influir en su calidad microbiológica (Piagentini, et al., 2003; Pirovani, et al., 2004), atributos sensoriales (Piagentini, et al., 2002; Pirovani, et al., 2009), potencial saludable (Pirovani, et al., 2015) y, por lo tanto, en su vida útil (Piagentini y Güemes, 2002). La vida útil de los productos frescos cortados es inferior a la de las frutas y hortalizas intactas de las que provienen, debido a que durante la elaboración sufren daño en su tejido, princi-

palmente en las etapas de pelado y corte, incrementando el deterioro microbiológico e induciendo cambios fisiológicos y bioquímicos que generan degradación del color, la textura y el sabor (Chung y Moon, 2009).

El pardeamiento enzimático imparte características sensoriales que desestimulan al consumidor a comprar frutas mínimamente procesadas y es considerado una de las principales limitantes de la vida útil de manzanas frescas cortadas (Rico, et al., 2007). Se han propuesto numerosas alternativas para solucionar este problema, entre las que se destacan los tratamientos con soluciones antioxidantes, que son una de las barreras utilizadas para preservar el color inicial en frutas frescas cortadas. El ácido ascórbico y sus derivados (solo o en combinación con ácido cítrico y/o sales de calcio) se han usado en varios estudios en frutas y hortalizas y su efecto para prevenir el pardeamiento ha sido demostrado (Piagentini y Güemes, 2002; Toivonen y Brummell, 2008; Piagentini, et al., 2012; Rodríguez Arzuaga, et al., 2013a). Sin embargo, la mayoría de estos agentes químicos tienen eficiencia variable y pueden generar sabores extraños.

El interés en la utilización de compuestos naturales para prevenir la pérdida de calidad en frutas frescas cortadas se ha incrementado notablemente como consecuencia del deseo del consumidor de reducir o eliminar los aditivos sintetizados químicamente en los alimentos (Lanciotti, et al., 2004). La yerba mate se elabora a partir de las hojas maduras de *Ilex paraguariensis* que son cosechadas, desecadas y luego molidas. Algunas de las propiedades farmacológicas atribuidas al mate se han relacionado con su alto contenido en compuestos fenólicos. El alto contenido de compuestos polifenólicos en el mate es responsable de sus notables propiedades antioxidantes (Bravo, et al., 2007) y lo convierten en un excelente candidato para aplicar como antioxidante natural a frutas frescas cortadas. Martín et al. (2010) encontraron que infusiones de yerba mate aplicadas a extractos de la enzima polifenol oxidasa (PPO) de manzanas ejercieron un significativo efecto inhibitorio sobre la actividad de dicha enzima. A pesar de su potencial efecto beneficioso, la investigación sobre la aplicación de soluciones de yerba mate en frutas frescas cortadas es sumamente limitada.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del mínimo procesamiento y de la aplicación de un tratamiento químico con una solución compuesta por 0,9% de ácido cítrico (ÁC), 1,0% de ácido ascórbico (ÁA) y 1,2% de yerba mate (YM) sobre las características fisicoquímicas, bioactivas, microbiológicas y sensoriales de manzanas Granny Smith.

## Materiales y Métodos

### Preparación de las muestras

#### Materia Prima (MP)

Se trabajó con manzanas variedad Granny Smith adquiridas en un comercio local de la ciudad de Santa Fe, Argentina. Teniendo en cuenta su menor susceptibilidad al desarrollo de pardeamiento y mayor firmeza y jugosidad, esta variedad es, entre las disponibles comercialmente, una de las más adecuadas para el procesamiento mínimo (Piagentini y

Pirovani, 2016). Una vez recibida la materia prima (20 kg), se almacenó en cámara refrigerada a 1,5 °C hasta el momento de la preparación.

### Preparación de la infusión de yerba mate (YM)

Se utilizó YM comercial de origen argentino del mismo lote, adquirida en un comercio de la zona. YM previamente pesada se agregó a agua a 90 °C (1,2 g por cada 100 mL), se agitó y se mantuvo tapada y en reposo durante 5 minutos. Luego se filtró con algodón, se dejó alcanzar temperatura ambiente y se agregó agua hasta completar el volumen total inicial (para compensar las pérdidas por evaporación). La infusión fue nuevamente filtrada utilizando papel de filtro.

### Muestras control (C) y tratadas (T)

Las manzanas se lavaron con 100 ppm de  $Cl_2$  (pH 7,0; 20 °C), se pelaron, descorazonaron y cortaron en octavos. Los octavos se desinfectaron con 30 ppm de  $Cl_2$  (pH 7,0; 20 °C). Las muestras C se sumergieron en agua y las T en una solución de [1,2% YM + 0,9% ÁC + 1,0% ÁA] (concentraciones determinadas previamente por Rodríguez Arzuaga, et al., 2013b) durante 3 minutos en una relación de 1 kg manzana por 3 L de solución. Se escurrieron por gravedad y por último sobre papel absorbente. Los octavos de manzana correspondientes a ambas muestras (C y T) se envasaron en bandejas de tereftalato de polietileno (PET) con tapa y se almacenaron en cámara a 1,5 °C hasta el momento de su análisis. Todos los ensayos se realizaron en el día del procesamiento de las manzanas.

### Análisis fisicoquímicos

#### pH y sólidos solubles

El pH se midió con un pH-metro Horiba B-213 y los sólidos solubles con un refractómetro digital "Pocket" ATAGO PAL-ALFA. Los resultados fueron expresados en °Brix.

#### Firmeza

Se determinó sobre la pulpa de la fruta utilizando un penetrómetro Penefel DFT Digital Firmness tester (Agro Technologies) con una punta de 11 mm. Los resultados se expresaron en Newton (N).

#### Color

Se determinó sobre la superficie cortada de la fruta con un espectrofotómetro Minolta 508d, iluminante D65, 10° y SCE, midiendo los parámetros CIELAB:  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ . También se determinaron los parámetros  $C_{ab}^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0.5}$  y el ángulo de tono  $h_{ab} = \arctan(b^*/a^*)$ .

### Polifenoles y capacidad antioxidante

#### Extracción

Se agregó acetona/agua 80/20 a las muestras molidas en una relación peso muestra:volumen solvente de 1:10. Luego se llevaron al ultrasonido por 15 minutos y se separó el sobrenadante

por centrifugación para la determinación de polifenoles totales y capacidad antioxidante (Rodríguez Arzuaga, et al., 2013a).

### Polifenoles totales

Se determinaron de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu modificado por Singleton y Rossi (1965) a través de la medida de la absorbancia a 760 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-Visible - MILTON ROY - Spectronic Génesis 5. Los resultados se expresaron en miligramos de ácido gálico equivalente (AGE) por 100 g.

### Capacidad antioxidante por el método del radical DPPH\*

Se cuantificó por la medida de la disminución de la absorbancia de una solución metanólica de DPPH\* de 30 mg/L a 517 nm en presencia del extracto después de 30 min de reacción. Se expresó como capacidad antioxidante equivalente al ácido ascórbico (AEAC) usando la ecuación de Lim et al. (2007) adaptada (1):

$$AEAC \text{ (mg } \dot{A}A/100g) = \frac{IC_{50(AA)} \times 10^5}{IC_{50(\text{muestra})}} \quad (1)$$

Donde:  $IC_{50(AA)}$  = cantidad de ácido ascórbico en 1 mL de reacción necesaria para disminuir al 50% la concentración inicial de DPPH\*, obtenida de graficar % DPPH\* remanente vs. concentración (mg AA/mL reacción).

$IC_{50(\text{muestra})}$  = cantidad de muestra en 1 mL de reacción necesaria para disminuir al 50% la concentración inicial de DPPH\*, obtenida de graficar % DPPH\* remanente vs. concentración (mL extracto/mL reacción).

$$\% \text{ DPPH}^*_{\text{remanente}} = [A_{\text{muestra}}/A_{\text{control}}] \times 100 \quad (2)$$

Donde:

$A_{\text{muestra}}$  = absorbancia final de la reacción entre la solución de DPPH\* y el extracto de la muestra (materia prima, manzana mínimamente procesada control o tratada, según corresponda).

$A_{\text{control}}$  = absorbancia solución de DPPH\*

### Capacidad antioxidante por el método de FRAP (*ferric reducing-antioxidant power*)

Se realizó una modificación del ensayo de FRAP propuesto por Benzie y Strain (1996). El reactivo FRAP se preparó con un buffer acetato 300 mM (pH 3,6), una solución de 10 mM de TPTZ en HCl 40 mM y una solución de cloruro de hierro (III) 20 mM, en una proporción de 10:1:1 (v/v), respectivamente. 50  $\mu$ L de extracto se incubaron junto con 900  $\mu$ L de reactivo de FRAP y 130  $\mu$ L de agua durante 30 minutos a 37 °C. Al cabo de este tiempo se midió la absorbancia a 593 nm. Se utilizó una curva de calibración de sulfato de hierro (II) y los resultados se expresaron en  $\mu$ Moles de Fe/100 g de pulpa de fruta.

## Ácido ascórbico y vitamina C

La determinación de ácido ascórbico y vitamina C se realizó de acuerdo a una adaptación del método propuesto por Van de Velde et al. (2012).

### Extracción y determinación

Se tomaron 25 g de muestra, se le agregaron 50 mL de solución extractante de ácido metafosfórico (30 g/L) y ácido acético (80 g/L) y se homogeneizó durante 1 minuto. Posteriormente la mezcla se sonicó en baño con ultrasonido y se centrifugó a 12000 g durante 20 minutos a 4 °C.

Para la determinación del ácido ascórbico (ÁA) se tomó 1 mL del sobrenadante, se le agregó 1 mL de fase móvil y se filtró en membrana Millipore de 0,45  $\mu$ M y se inyectó en el HPLC. Para la determinación de la vitamina C (ÁAT) se tomaron 2 mL del sobrenadante y se le agregó 0,5 mL de solución de DL-ditiotreitol (DTT) 5 g/L, preparada en fosfato de potasio dibásico 2,58 M; la mezcla se dejó reaccionar durante 2 horas en la oscuridad. Luego, se tomó 1 mL de la mezcla de sobrenadante y solución de DTT y se le agregó 1 mL de fase móvil, se filtró en membrana Millipore de 0,45  $\mu$ M y se inyectó en el HPLC.

El contenido de ácido dehidroascórbico (ÁDHA) de las muestras se calculó como la diferencia entre los contenidos de ÁAT y ÁA (Sánchez-Mata, et al., 2000). Todas las muestras se protegieron de la luz y se manipularon en baño de hielo para evitar pérdidas por oxidación.

### Equipamiento y condiciones cromatográficas

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida KONIK KNK-500-A series, unido a un detector UV de longitud de onda variable (UVIS 200 Konik Instruments, Barcelona, España). Las muestras se inyectaron en el sistema cromatográfico a través de un inyector manual Rheodyne 7725i provisto de un loop de 20  $\mu$ L (Rheodyne, Berkeley, CA, EE.UU.).

La fase móvil consistió de 95% buffer acetato de sodio/ácido acético 0,03 M y 5% metanol. El pH se ajustó a 5,8 y la fase móvil fue filtrada a través de una membrana Millipore de 0,45  $\mu$ M y desgasificada usando vacío.

La separación se realizó en una columna de fase reversa Phenomenex Gemini 5 $\mu$  C18 110A con un guardacolumna (Phenomenex Inc. CA, USA) a temperatura ambiente (25 °C). La velocidad de flujo se fijó en 1,15 mL/min y las medidas se realizaron a 251 nm.

### Análisis microbiológicos

10 g de muestra se trituraron en 90 mL en agua de peptona al 0,1% en stomacher. Las diluciones decimales necesarias se sembraron en los distintos medios de cultivo por duplicado. Las placas se incubaron durante los tiempos y a las temperaturas específicas para cada recuento. Los resultados se expresaron en log UFC/g.

### Aerobios mesófilos totales (AMT)

Se empleó Agar para Recuento en Placa y se incubaron a 30 °C durante 48 horas.

## Psicrotrofos

Se empleó Agar para Recuento en Placa. Las placas se incubaron a 7 °C durante 10 días.

## Mohos y levaduras

Se empleó Agar Extracto de levadura, glucosa y cloranfenicol. Las placas se incubaron a 28 °C durante 3 a 5 días.

## Evaluación sensorial

Un panel sensorial entrenado del Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA-FIQ-UNL), compuesto por ocho jueces con experiencia en evaluación de vegetales mínimamente procesados, evaluó todas las muestras. Los atributos estudiados, seleccionados de acuerdo a Rodríguez Arzuaga (2015), fueron: apariencia general, pardeamiento, sabor característico, gusto ácido, crujencia, astringencia, jugosidad, sabores extraños y olores extraños. Se utilizaron escalas no estructuradas de 10 cm con términos ancla ubicados a 1 cm de cada extremo: “1: Mala” y “9: Muy buena” para apariencia general, “1: Muy poco” y “9: Mucho” para pardeamiento, crujencia, jugosidad y astringencia, y “1: Apenas perceptible” y “9: Muy perceptible” para sabor característico, gusto ácido, sabores extraños y olores extraños.

## Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza para comparar los resultados obtenidos para los distintos tratamientos. Se aplicó el test de Tukey ( $p < 0,05$ ) para detectar diferencias significativas entre muestras. Se utilizó el software Statgraphics Centurion XV.

## Resultados y Discusión

No se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el pH y firmeza de las muestras MP y C (Tabla 1), por lo que el mínimo procesamiento sin tratamiento químico no afectó estos parámetros. Por otro lado, el mínimo procesamiento con tratamiento (muestra T) redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) el pH respecto a MP, lo que era esperable por la aplicación de una solución con pH 2,81. En cuanto a la firmeza, no se detectó diferencia significativa entre las muestras C y T ( $p > 0,05$ ), sin embargo la firmeza de la muestra tratada químicamente (T) fue 10,8% menor que la materia prima (MP). El mínimo procesamiento de las manzanas puede contribuir a la pérdida de firmeza debido a la acción de enzimas pécticas. Al cortar las superficies, la compartimentación subcelular se rompe y se ponen en contacto enzimas y sustratos que en el tejido intacto generalmente están separados, pudiendo comenzar reacciones que en condiciones normales no ocurren (Rojas-Graü, et al., 2008). Por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio la pérdida de firmeza se atribuiría a las operaciones físicas asociadas al mínimo procesamiento y no a la aplicación del tratamiento químico.

La materia prima (MP) presentó el mayor contenido de sólidos solubles, seguida por la muestra T. Esto puede explicarse por la lixiviación de compuestos solubles al sumergir las manzanas en las soluciones. En el caso de T, la reducción del contenido de sólidos solubles es menor que en la muestra control (C) (Tabla 1) porque la solución aplicada tiene un contenido de sólidos solubles de 2,3°Brix.

Muestra	pH	Sólidos solubles (°Brix)	Firmeza (N)
MP	3,44 <sup>b</sup>	11,8 <sup>c</sup>	68,6 <sup>b</sup>
C	3,43 <sup>ab</sup>	10,2 <sup>a</sup>	65,6 <sup>ab</sup>
T	3,35 <sup>a</sup>	11,0 <sup>b</sup>	61,2 <sup>a</sup>

Letras distintas entre filas indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ , test de Tukey). MP: materia prima; C: control; T: tratada.

**Tabla 1.** pH, sólidos solubles y firmeza de las muestras MP, C y T de manzanas Granny Smith.

Otros autores han reportado valores de sólidos solubles, pH y firmeza de manzanas Granny Smith similares a los aquí determinados para la materia prima (Gómez, et al., 2012; Altisent, et al., 2014). Rodríguez Arzuaga et al. (2013a) compararon el comportamiento de manzanas Granny Smith sin mínimo procesamiento (MP), mínimamente procesadas sin tratamiento químico (T1) y tratadas químicamente con [0,5% ÁC+0,5% AA+0,25% cloruro de calcio] (T2) y con [1,0% ÁC+1,0% AA+0,5% cloruro de calcio] (T3). Para la materia prima reportaron resultados muy similares a los aquí presentados (pH 3,43; sólidos solubles 12,3; °Brix y firmeza 71,36 N) y también observaron que al procesar la muestra sin tratamiento químico el contenido de sólidos solubles descendió y el pH se mantuvo, pero obtuvieron una disminución en la firmeza. A su vez, los tratamientos químicos aplicados por los autores generaron un descenso del pH, la firmeza y los sólidos solubles respecto a la materia prima, que es el mismo comportamiento observado en este estudio.

En la **Tabla 2** se presentan los resultados de los parámetros de color  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$ .  $L^*$  representa la luminosidad, mayores valores de  $L^*$  corresponden a muestras más claras, mientras que valores negativos de  $a^*$  se corresponden con tonos verdes y valores positivos con tonos rojos. Las manzanas tratadas (T) presentaron los mayores valores de luminosidad ( $L^*$ ) y ángulo de tono ( $h_{ab}$ ) y el menor valor de  $a^*$ . El pardeamiento enzimático ocurre a través de la oxidación de orto-fenoles a quinonas, por la acción de sistemas enzimáticos tales como la polifenol oxidasa (PPO), que luego se polimerizan a pigmentos amarrados. La PPO generalmente se asocia al plastidio y a los sustratos fenólicos que se encuentran en la vacuola, pero la disrupción celular y extracelular, que ocurre en las etapas de pelado, descorazonado y corte del mínimo procesamiento, permite que el sustrato y la enzima se pongan en contacto y, por lo tanto, reaccionen para producir pardeamiento (Roksana, et al., 2013). El resultado de la reacción de pardeamiento se ve reflejado en una disminución de  $L^*$  (muestra más oscura) y un aumento de  $a^*$  (pérdida de tonos verdes o desarrollo de tonos rojizos), por ende, el hecho de que la muestra T presente la luminosidad más alta y el  $a^*$  más bajo puede atribuirse a que el tratamiento químico aplicado inhibió o retardó el pardeamiento. Las manzanas T también presentaron los valores de  $b^*$  y  $C_{ab}^*$  más bajos (color menos intenso), aunque para estos parámetros no se detectó diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre T y C. Por otro lado, no se detectaron diferencias significativas entre MP y C para ninguno de los parámetros instrumentales de color determinados.

Altisent et al. (2014) midieron el color de manzanas Granny Smith reportando valores de  $L^*$  de 79,6 y de  $h_{ab}$  de 111,3 que son comparables con los datos obtenidos en este estudio para MP. Piagentini et al. (2012) determinaron el color de

manzanas Granny Smith mínimamente procesadas tratadas con [1% ÁC+1% ÁA] y sin tratar, obteniendo valores de  $L^*$  de alrededor de 75 y 80, y de  $a^*$  de 2 y -0,8 en las manzanas sin tratar y tratadas, respectivamente. Los resultados de  $L^*$  para ambas muestras son comparables a los aquí presentados para C y T, mientras que los de  $a^*$  son más altos, especialmente en el caso de las manzanas sin tratamiento químico.

En su estudio, Rodríguez Arzuaga et al. (2013a) aplicaron un tratamiento químico con concentraciones similares de ácidos cítrico y ascórbico pero sin yerba mate (T3: 1,0% ÁC+1,0% ÁA+0,5% cloruro de calcio) a manzanas Granny Smith mínimamente procesadas. Para las manzanas tratadas reportaron valores de  $a^*$  significativamente menores y valores de  $h_{ab}$  significativamente mayores que para las manzanas mínimamente procesadas sin tratar, coincidiendo con los valores presentados en la **Tabla 2**. Sin embargo, estos autores no detectaron diferencias significativas entre los valores de  $L^*$  de ambas muestras. Estos resultados podrían sugerir que el tratamiento químico con YM aquí propuesto es más eficiente para evitar el oscurecimiento de las manzanas que uno similar sin YM.

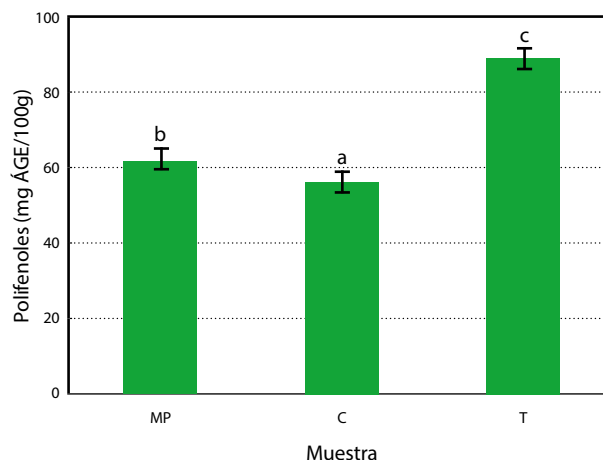
Muestra	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C_{ab}^*$	$h_{ab}$
MP	76,40 <sup>a</sup>	-0,38 <sup>b</sup>	17,66 <sup>b</sup>	17,68 <sup>b</sup>	91,25 <sup>a</sup>
C	75,87 <sup>a</sup>	-0,22 <sup>b</sup>	16,71 <sup>a,b</sup>	16,71 <sup>a,b</sup>	90,80 <sup>a</sup>
T	77,77 <sup>b</sup>	-1,31 <sup>a</sup>	16,27 <sup>a</sup>	16,33 <sup>a</sup>	94,75 <sup>c</sup>

Letras distintas entre filas indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ , test de Tukey). MP: materia prima; C: control; T: tratada.

**Tabla 2.** Parámetros instrumentales de color de las muestras MP, C y T de manzanas Granny Smith.

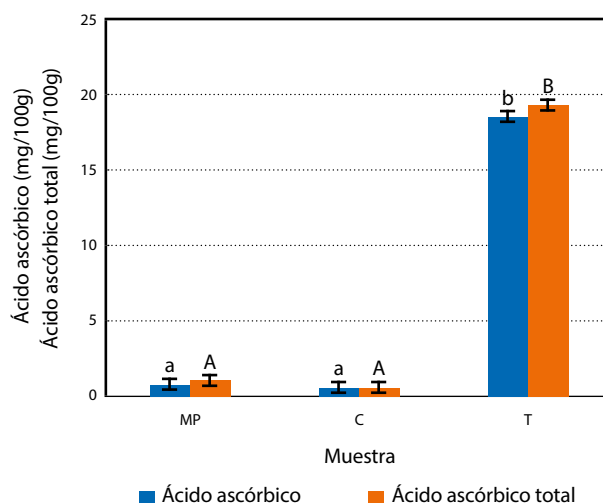
Los resultados de polifenoles totales se expresan en el **Gráfico 1**. La YM presente en la solución aplicada a las muestras T es rica en compuestos polifenólicos (Bravo et al., 2007), lo que se traduce en un incremento de estos compuestos en las manzanas tratadas (40% superior a MP). Por otro lado, C presenta un contenido significativamente menor de polifenoles que MP, posiblemente por la pérdida durante el lavado con agua (**Gráfico 1**). Similarmente, Rodríguez Arzuaga et al. (2013a) obtuvieron el menor contenido de polifenoles en las manzanas mínimamente procesadas lavadas con agua. Altisent et al. (2014) reportaron un contenido de polifenoles totales de Granny Smith de 54,8 mg AGE/100 g, que es comparable con el resultado obtenido en este estudio para MP (61,3 mg AGE/100 g).

En el **Gráfico 2** se presentan los resultados correspondientes al ácido ascórbico (ÁA) y ácido ascórbico total (ÁAT) o vitamina C (ÁA + ácido dehidroascórbico) obtenidos para las tres muestras evaluadas. T presentó un contenido significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) de ÁA y ÁAT, lo que demuestra que al menos parte del ácido ascórbico presente en la solución aplicada penetró las manzanas. No se detectó diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre los resultados obtenidos para las muestras MP y C, por lo que se puede concluir que el mínimo procesamiento y el lavado con agua no tienen un efecto inmediato sobre el ácido ascórbico naturalmente presente en las manzanas. Altisent et al. (2014) analizaron el contenido de ácido ascórbico y ácido ascórbico total de manzanas Granny Smith y obtuvieron 1,8 y 2,2 mg/100 g, respectivamente. Comparando esos resultados con los aquí presentados para MP (1,5 y 1,8 mg/100 g), se observa que son muy similares.



Letras distintas indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ , test de Tukey) entre muestras. MP: materia prima; C: control; T: tratada.

**Gráfico 1.** Contenido de polifenoles de las muestras MP, C y T de manzanas Granny Smith.

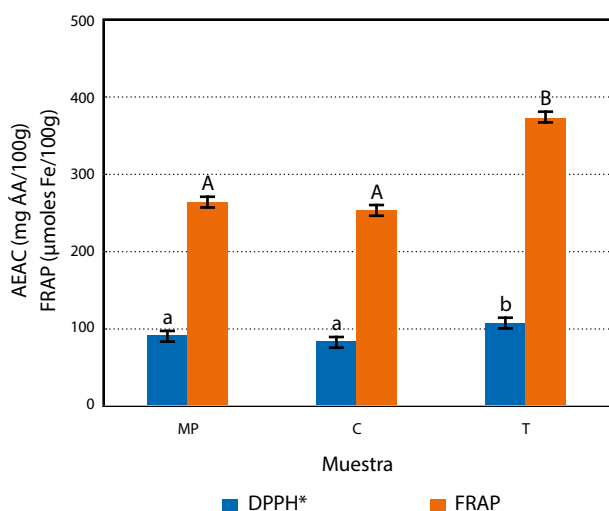


**Gráfico 2.** Contenido de ácido ascórbico y ácido ascórbico total de las muestras MP, C y T de manzanas Granny Smith.

MP: materia prima; C: control; T: tratada. Letras distintas dentro de cada serie de datos indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ , test de Tukey) entre muestras para cada parámetro

El ácido ascórbico representa el 86, 93 y 96% del ácido ascórbico total presente en MP, C y T, respectivamente. Esto es positivo desde el punto de vista nutricional, ya que el ácido L-ascórbico es el isómero biológicamente activo con mayor actividad como vitamina C, mientras que aún hay discusión sobre la actividad vitamínica del ácido L-dehidroascórbico (ÁDHA), aunque algunos autores indican que tiene un 10% de la actividad como vitamina C del ÁA (Nováková, et al., 2008).

En el **Gráfico 3** se presentan los resultados de capacidad antioxidante (CAO) obtenidos por los dos métodos aplicados. En ambos casos, T presentó la mayor actividad antioxidante (27 y 43% superior a MP, determinadas por DPPH\* y FRAP, respectivamente) y no se detectó diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre MP y C. El aumento en la CAO en T se debe tanto al aporte de polifenoles realizado por la YM, como al ácido ascórbico presente en la solución antioxidante aplicada.



MP: materia prima; C: control; T: tratada. Letras distintas dentro de cada serie de datos indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ , test de Tukey) entre muestras para cada parámetro.

**Gráfico 3.** Capacidad antioxidante por los métodos del radical DPPH\* y FRAP, de las muestras MP, C y T de manzanas Granny Smith.

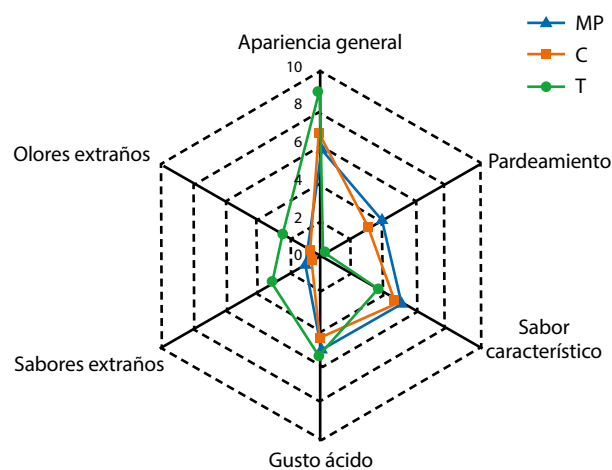
La disminución del contenido de polifenoles de C no se tradujo en un descenso significativo de su capacidad antioxidante.

En general, los recuentos microbiológicos obtenidos no superaron los 2 órdenes logarítmicos (Tabla 3). No se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre MP, C y T para psicrotrofos, mohos y levaduras. Estos resultados sugieren que el mínimo procesamiento, con o sin tratamiento químico, no aumentó la carga de estos microorganismos. En cuanto a los aerobios mesófilos totales (AMT), C presentó un contenido significativamente menor, mientras que no hubo diferencias significativas entre los resultados obtenidos para MP y T. Se realizaron recuentos microbiológicos de AMT, psicrotrofos, mohos y levaduras en la solución antioxidante aplicada obteniéndose recuentos inferiores a 10 UFC/g. Wu et al. (2012) determinaron la carga de aerobios mesófilos totales, psicrotrofos y mohos y levaduras en manzanas Fuji frescas cortadas sin tratamiento químico y obtuvieron valores de 2,1, 2,6 y 3,1 log UFC/g, respectivamente. Rojas-Graü et al. (2008) también determinaron AMT en manzanas 'Fuji' frescas cortadas sin tratar químicamente y obtuvieron cargas de 3 log UFC/g. Ambos estudios presentan recuentos algo superiores a los correspondientes a la muestra C (Tabla 3).

Muestra	AMT (log UFC/g)	Psicrotrofos (log UFC/g)	Mohos (log UFC/g)	Levaduras (log UFC/g)
MP	1,6 <sup>b</sup>	1,4 <sup>a</sup>	1,4 <sup>a</sup>	1,2 <sup>a</sup>
C	1,0 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>	1,1 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>
T	1,7 <sup>b</sup>	1,1 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>

Letras distintas entre filas indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ , test de Tukey). MP: materia prima; C: control; T: tratada.

**Tabla 3.** Recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales (AMT), psicrotrofos, mohos y levaduras de las muestras MP, C y T de manzanas Granny Smith.



MP: materia prima; C: control; T: tratada.

**Gráfico 4.** Gráfico de araña para los atributos sensoriales: apariencia general, pardeamiento, sabor característico, gusto ácido, sabores extraños y olores extraños, de las muestras MP, C y T de manzanas Granny Smith.

El mínimo procesamiento y el tratamiento químico no afectaron significativamente ( $p > 0,05$ ) la astringencia, crujencia y jugosidad de las manzanas, con valores promedio  $1,5 \pm 0,9$ ;  $8,0 \pm 0,8$  y  $7,6 \pm 0,9$ , respectivamente. La materia prima (MP) obtuvo el menor valor en apariencia general ( $6,1 \pm 0,7$ ) y el mayor valor en pardeamiento ( $4,1 \pm 1,0$ ). Por otra parte, la muestra tratada (T) obtuvo el mayor valor en apariencia general ( $9,0 \pm 0,4$ ) y el menor desarrollo de pardeamiento ( $0,3 \pm 0,4$ ) (Gráfico 4). Estos resultados indican que el tratamiento químico ejerce un efecto inmediato evitando el desarrollo de pardeamiento enzimático en las manzanas. A su vez, el hecho de que la muestra C presente mejor apariencia ( $6,9 \pm 1,1$ ) que MP puede deberse a que el lavado de los octavos de manzana reduce el contenido de sustancias que actúan como sustrato en la reacción de pardeamiento enzimático, lo que coincide con el menor contenido de polifenoles totales determinado (Gráfico 1). Las operaciones básicas de procesamiento mínimo (lavado, pelado, descorazonado y cortado) no influyeron en el sabor característico, gusto ácido y presencia de sabores y olores extraños (no se obtuvieron diferencias significativas entre MP y C) (Gráfico 4). Sin embargo, el tratamiento químico disminuyó ligeramente el sabor característico y aumentó entre 0,5 y 2,3 puntos el gusto ácido, sabores extraños y olores extraños (Gráfico 4).

Comparando los resultados instrumentales con los resultados sensoriales para cada una de las muestras, se puede observar que T presentó el menor pH y eso se reflejó sensorialmente, ya que fue la muestra con mayor gusto ácido. En cuanto a la firmeza, si bien instrumentalmente se detectó un descenso en las manzanas tratadas, la pérdida de firmeza no generó pérdida de crujencia de las muestras (las tres fueron similares desde el punto de vista estadístico). Los resultados instrumentales y sensoriales coincidieron en que T fue la muestra que desarrolló menor pardeamiento (mayor  $L^*$ , menor  $a^*$ , menor  $C_{ab}^*$  y menor puntaje en el atributo pardeamiento).

## Conclusiones

El mínimo procesamiento realizado sin tratamiento químico no afectó el pH, la firmeza ni los parámetros instrumentales de color, pero sí generó un descenso significativo del contenido de sólidos solubles y del recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales. En cuanto al potencial saludable, disminuyó el contenido de polifenoles totales, pero no el contenido de ácido ascórbico y vitamina C y la capacidad antioxidante. No se vieron afectadas las características sensoriales relativas al sabor (sabor característico, gusto ácido, sabores extraños y olores extraños), así como la astringencia, crujencia y jugosidad de las muestras, pero sí se obtuvo mejor apariencia general y menor desarrollo de pardeamiento en C que en MP.

La aplicación de la solución con 1,2% YM; 0,9% ÁC y 1,0% ÁA produjo un incremento del contenido de sólidos solubles y de los parámetros de color  $L^*$  y  $h_{ab}$ , y un descenso del parámetro  $a^*$ , respecto de la muestra C. Los valores de los parámetros instrumentales de color junto con la mejora de la apariencia general sensorial y del menor pardeamiento evaluado sensorialmente pone en evidencia que el tratamiento químico aplicado fue efectivo en controlar el desarrollo de pardeamiento enzimático, así como en incrementar significativamente ( $p < 0,05$ ) el potencial saludable de manzanas Granny Smith mínimamente procesadas (mayor contenido de polifenoles y vitamina C, y mayor capacidad antioxidante), manteniendo bajos recuentos microbiológicos similares a los encontrados en la materia prima.

## Reconocimientos

Trabajo realizado con fondos de la Universidad Nacional del Litoral a través de la programación CAI+D 2011. El Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) financió la estadia de Mariana Rodríguez Arzuaga en Santa Fe. Se agradece a la Mag. Cecilia Bernardi, a la Lic. Nora Sabbag y a la Tca. María A. Moguevsky por su asistencia técnica en este trabajo.

## Referencias

- Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M. y Abadias, M., 2011. Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut Apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. En: *Food Microbiology*, 28, pp.59-66.
- Altisent, R., Plaza, L., Alegre, I., Viñas, I. y Abadias, M., 2014. Comparative study of improved vs. traditional apple cultivars and their aptitude to be minimally processed as 'ready to eat' apple wedges. En: *LWT-Food Science and Technology*, 58, pp.541-549.
- Benzie, I. y Strain, J., 1996. The ferric reducing ability plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. En: *Analytical Biochemistry*, 239, pp.70-76.
- Bravo, L., Goya L. y Lecumberri, E., 2007. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. En: *Food Research International*, 40, pp.393-405.
- Cano, M.P., Sánchez-Moreno, C., de Pascual-Teresa y S., de Ancos, B.J.C., 2005. Procesado mínimo y valor nutricional. En: González-Aguilar, G.A., Gardea, A.A. y Cuamea-Navarro, F., ed., 2005. *Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados*. Hermosillo: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, pp.155-176.
- Chung, H. y Moon, K., 2009. Browning characteristics of fresh-cut 'Tsugaru' apples as affected by pre-slicing storage atmospheres. En: *Food Chemistry*, 114, pp.1433-1437.
- Gómez, P., García-Loredo, A., Nieto, A., Salvatori, D., Guerrero, S. y Alzamora, S., 2012. Effect of pulsed light combined with an antibrowning pretreatment on quality of fresh cut apple. En: *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, pp.102-112.
- Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M.E. y Gardini, F., 2004. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. En: *Trends in Food Science & Technology*, 15, pp.201-208.
- Lim, Y.Y., Lim, T.T. y Tee, J.J., 2007. Antioxidant properties of several tropical fruits: a comparative study. En: *Food Chemistry*, 103, pp.1003-1008.
- Martín, L., Bernardi, C. y Piagentini, A.M., 2010. Inhibición de la actividad de la enzima polifenoloxidasas de manzana var. Princesa con extractos de yerba mate. En: AUGM, UNL. *Actas de la XVIII Jornadas de Jóvenes Investigadores, Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM)*. Santa Fe: AUGM, UNL.
- Nováková, L., Solich, P. y Solichová, D., 2008. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. En: *Trends in Analytical Chemistry*, 27(10), pp.942-958.
- Piagentini, A.M. y Güemes, D.R., 2002. Shelf life of fresh-cut spinach as affected by chemical treatment and type of packaging film. En: *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 19(4), pp.383-389.
- Piagentini, A.M., Güemes, D.R. y Pirovani, M.E., 2002. Sensory characteristics of fresh-cut spinach preserved by combined factors methodology. En: *Journal of Food Science*, 67(4), pp.1544-1549.
- Piagentini, A.M., Güemes, D.R. y Pirovani, M.E., 2003. Mesophilic aerobic population of fresh-cut spinach as affected by chemical treatment and type of packaging film. En: *Journal of Food Science*, 68(2), pp.602-607.
- Piagentini, A., Martín, L., Bernardi, C., Güemes, D. y Pirovani, M., 2012. Color changes in fresh-cut fruits as affected by cultivar, chemical treatment and storage time and temperature. En: Caivano, J.L. y Buera, M.P., ed., 2012. *Color in Food: Technological and Psychophysical Aspects*. Boca Raton: CRC. pp.263-270.
- Piagentini, A.M. y Pirovani, M.E., 2016. Total phenolics content, antioxidant capacity, physicochemical attributes and browning susceptibility of different apple cultivars for minimal processing. En: *International Journal of Fruits Science*, en prensa.
- Pirovani, M.E., Piagentini, A.M., Güemes, D.R. y Arkwright, S., 2004. Reduction of chlorine concentration and microbial load during washing-disinfection of shredded lettuce. En: *International Journal of Food Science and Technology*, 39, pp.341-347.
- Pirovani, M.E., Piagentini, A.M., Güemes, D.R., Rodríguez, S.C., Qüesta, A.G. y Casóliba, R.M., 2009. Calidad sensorial y nutricional de vegetales de hojas frescos cortados. En: González Aguilar, G.A., Álvarez Parrilla, E., de la Rosa, L., Olivas, I.G. y Ayala Zavala, J.F., ed., 2009. *Aspectos nutricionales y sensoriales de vegetales frescos cortados*. México : Trillas, CIAD-UAJC. pp.64-97.

- Pirovani, M., Piagentini, A.M. y Van De Velde, F., 2015. Bioactive compounds in fresh-cut fruits: occurrence and impact of processing and cold storage. En: Gupta, V.K., Tuohy, M.G., O'Donovan, A. y Lohani, M., ed., 2015. *Biotechnology of bioactive compounds: sources and applications in foods and pharmaceuticals*. London: John Wiley & Sons. p.736.
- Rico, D., Martín-Diana, A.B., Barat, J.M. y Barry-Ryan, C., 2007. Extending and measuring the quality of fresh cut fruit and vegetable: a review. En: *Trends in Food Science & Technology*, 18, pp.373-386.
- Rodríguez Arzuaga, M., 2015. *Aplicación de tratamientos térmicos suaves y antioxidantes de origen natural a manzanas frescas cortadas*. Santa Fe: Universidad Nacional del Litoral. (Tesis de Maestría).
- Rodríguez Arzuaga, M., Güemes, D., Benavides, M., Rivas, M., Pirovani, M. y Piagentini, A., 2013a. Evaluación preliminar del efecto del tratamiento químico sobre atributos fisicoquímicos, sensoriales y bioactivos de manzanas frescas cortadas. En: *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 14(2), pp.223-229.
- Rodríguez Arzuaga, M., Costa, S., Caballero, S., Sabbag, N. y Piagentini, A., 2013b. Determinación de las concentraciones óptimas de una solución de yerba mate para incrementar el potencial saludable y reducir el pardeamiento en manzanas frescas cortadas. En: CYTAL. *Actas del IX Congreso de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL)*. Rosario: CYTAL, AATA.
- Rojas-Graü, M.A., Tapiam M.S. y Martín-Belloso, O., 2008. Using polysaccharide-based edible coatings to maintain quality of fresh-cut Fuji apples. En: *LWT-Food Science and Technology*, 41, pp.139-147.
- Roksana, H., Wills, R.B.H., Pristijono, P. y Golding, J.B., 2013. Effect of nitric oxide (NO) and associated control treatments on the metabolism of fresh-cut apple slices in relation to development of surface browning. En: *Postharvest Biology and Technology*, 78, pp.16-23.
- Sánchez-Mata, M.C., Cámara-Hurtado, M., Díez-Márquez, C. y Torija-Isasa, M.E., 2000. Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). En: *European Food Research and Technology*, 210, pp.220-225.
- Singleton, V. y Rossi, J., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. En: *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, pp.144-158.
- Toivonen, P.M.A. y Brummell, D.A., 2008. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. En: *Postharvest Biology and Technology*, 28, pp.1-14.
- Van de Velde, F., Pirovani, M.E., Cámara, M.S., Güemes, D.R. y Bernardi, C., 2012. Optimization and validation of a UV-HPLC for vitamin C determination in strawberries (*Fragaria ananassa* Duch.), using experimental designs. En: *Food Analytical Methods*, 5, pp.1097-1104.
- Wu, Z.S., Zhang, M. y Wang, S., 2012. Effects of high pressure argon treatments on the quality of fresh-cut apples at cold storage. En: *Food control*, 23, pp.120-127.



# ***Lactococcus lactis* autóctono: evaluación del efecto antilisterial y de propiedades sensoriales en quesos tipo Cuartirolo**

## **Autochthonous *Lactococcus lactis* strain: evaluation of antilisterial activity and sensory properties in Cuartirolo cheese**

González Revello, Álvaro (1), Carro, Silvana (1), Cal, Karina (1), Giacaman, Sheila (2), Aldrovandi, Ariel (1) Departamento Ciencia y Tecnología de la Leche, Facultad de Veterinaria, UdelaR – (2) Ejercicio liberal (3) Departamento Ciencia y Tecnología de la Carne, Evaluación Sensorial, Facultad de Veterinaria, UdelaR

Contacto: silvana.carro@gmail.com

RECIBIDO: 2/11/2016 – APROBADO: 13/12/2016

### **Resumen**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) forman parte de la microbiota natural láctea y son componentes de muchos cultivos iniciadores para elaboración quesera. Las BAL pueden presentar actividad antimicrobiana por la producción de diferentes sustancias, entre ellas, péptidos, denominados bacteriocinas, que pueden ser producidas in situ en la tina quesera. Algunas bacteriocinas incluyen en su espectro de acción *Listeria monocytogenes*, patógeno asociado a alimentos que representa un riesgo para la salud pública. Este trabajo propuso evaluar el efecto antilisterial de una BAL autóctona en quesos tipo Cuartirolo y la modificación de las propiedades sensoriales por su aplicación. El diseño experimental incluyó dos tratamientos (con o sin *Lactococcus lactis* autóctono). Los quesos de ambos tratamientos se dividieron en dos, el primer lote se inoculó con *Listeria innocua* y se realizó recuento a las 2 horas y a los 7 y 14 días. El restante se evaluó sensorialmente mediante una técnica sensorial descriptiva. Se comprobó que *Lactococcus lactis* GU967439 tiene actividad antagonista in vitro contra *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes*. También existieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos en el recuento de *Listeria innocua* en las muestras de quesos evaluadas. A excepción del sabor salado, las propiedades sensoriales no mostraron diferencias significativas entre tratamientos.

**Palabras clave:** Bacterias ácido lácticas, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, bacteriocinas.

### **Abstract**

Acid lactic bacteria (LAB) are part of milk natural microbiota and are components of many starter cultures used in cheese making. The LAB may exhibit antimicrobial activity, based on the production of various substances, among them, peptides called bacteriocins that can be produced in situ in cheese making.

Some bacteriocins include in their spectrum of action *Listeria monocytogenes*, pathogen associated to food that represents a risk to public health. The aim of this study was to evaluate antilisterial effect of an autochthonous LAB in Cuartirolo cheese and determine if its use altered the sensory properties of that cheese. This experimental design included two treatments: with and without autochthonous *Lactococcus lactis*. Cheese was divided into two groups, the first one was inoculated with *Listeria innocua*, making the quantification two hours, seven days and fourteen days later. Regarding sensory evaluation a descriptive sensory technique was used. In this study, *Lactococcus lactis* GU96743 had an antagonistic activity in vitro against *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. There were also significant differences ( $p < 0,05$ ) between the treatments in quantification of *Listeria innocua* in the samples of cheese evaluated. Except for the salty flavor, the sensorial properties did not show differences between treatments.

**Keywords:** Lactic Acid Bacteria, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*, bacteriocin.

## **Introducción**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen parte de la microbiota natural de la leche, son un grupo de microorganismos de gran importancia desde el punto de vista aplicado y son los componentes fundamentales de muchos de los

cultivos iniciadores utilizados en la industria alimentaria. Tradicionalmente han sido empleadas empírica o deliberadamente en la elaboración de diversos productos, entre los que se encuentran derivados lácteos como quesos, yogur,

etcétera. Adicionalmente a su utilización en los productos fermentados, se han desarrollado estudios para incluir algunas BAL en cultivos denominados “bioprotectores”. El término “bioconservación” o “bioprotección” se define como la prolongación de la vida útil e incremento de la seguridad sanitaria de los alimentos mediante la microbiota natural o sus metabolitos (Devlieghere, et al., 2004). Estas bacterias tienen un gran potencial para este fin, ya que son seguras para el consumo (*status GRAS*: “generalmente reconocidas como seguras”, otorgado por la Food and Drug Administration-FDA) y predominan en la microbiota de muchos alimentos.

El principal factor en el que se basa su actividad antimicrobiana es la producción de ácidos (fundamentalmente ácido láctico) con consecuente disminución del pH, a lo que se suma la competencia por nutrientes presentes en el sustrato. Las BAL son capaces también de producir otras sustancias inhibitorias, tales como: acetaldehído, diacetil, metabolitos activos del oxígeno (peróxido de hidrógeno y radicales libres), CO<sub>2</sub> y bacteriocinas. Estas últimas son sustancias proteicas de síntesis ribosomal que pueden ser sintetizadas por numerosas bacterias Gram+ y Gram-. Más de 300 tipos diferentes de bacteriocinas se han descrito producidas por: Lactobacilos, Lactococos, Leuconostoc, Pediococos y Enterococos (De Vuyst y Vandamme, 1994; Osuntoki, et al., 2003; García, et al., 2010; Balciunas, et al., 2013).

Diferentes cepas de *Lactococcus lactis* forman parte de la mayoría de los cultivos iniciadores comerciales de BAL utilizados en la industria láctea para la elaboración de queso y otros productos fermentados. Se han identificado y caracterizado varias cepas de *Lactococcus lactis* aisladas de distintas fuentes y que producen diferentes bacteriocinas (Ayad, et al., 2004). Así, nisina fue la primera bacteriocina aislada producida por *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*. Fue descubierta en 1928 luego de observarse que durante la maduración de quesos determinadas cepas de *Lactococcus lactis* inhibían el crecimiento de bacterias patógenas y que, además, no era perjudicial para la salud (Montville y Chen, 1998). Al momento han sido identificadas cinco variantes naturales de nisina (A, Z, Q, U y F). Otros péptidos antimicrobianos producidos por *L. lactis* incluyen a la Lacticina 481, Lacticina 3147, Lactococinas mMFII, A (Diplococcina), B, G, M, Q y 972 (Venema, et al., 1995; De Vuyst, et al., 2007; Oppgård, et al., 2007; Trmcic, et al., 2008; Alegría, et al., 2010).

El espectro de acción antimicrobiano de algunas bacteriocinas es amplio e incluye microorganismos patógenos como, por ejemplo, *Listeria monocytogenes*. Este microorganismo es un patógeno alimentario importante en la industria láctea, ya que es capaz de crecer en refrigeración (Gandhi y Chikindas, 2007). De acuerdo a lo citado por Lundén et al. (2004), los productos lácteos han sido asociados con aproximadamente la mitad de los brotes de listeriosis en Europa.

Actualmente se buscan sistemas combinados de métodos de conservación para la obtención de alimentos seguros, lo que reduce las concentraciones de aditivos químicos y/o de la intensidad de los tratamientos tecnológicos aplicados (Chen y Hoover, 2003). En este sentido, las bacteriocinas presentan determinadas características que las hacen atractivas para su empleo como bioconservantes, como su naturaleza peptídica, con la consecuente degradación por enzimas digestivas, y resultan inocuas para el consumidor y su microbiota intestinal (Martínez, 1996). Sin embargo, antes de utilizar una BAL productora de bacteriocina como biopreservador es necesario estudiar su eficacia y las concentraciones para lograr un eficien-

te control de patógenos responsables de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). También es primordial evaluar la capacidad de la cepa para su crecimiento y producción de bacteriocina en la matriz alimentaria estudiada (Ananou, et al., 2005). Desde hace un tiempo se desarrollan estudios basados en la aplicación de BAL autóctonas como *starter* o adjunto en elaboración de diversas variedades de quesos para verificar su poder antilisterial (Alegría, et al., 2010; Mendonça, et al., 2010; Hartmann, et al., 2011; Dal Bello, et al., 2012).

Por otra parte, las BAL juegan un rol relevante en la elaboración de quesos, incrementando la diversidad de sabores y texturas. Es importante señalar que las BAL nativas pueden caracterizar el queso de una región geográfica (Albenzio, et al., 2001; Wouters, et al., 2002; Randazzo, et al., 2009). En quesos tradicionales la adición de cepas bacterianas que no forman parte de la microbiota autóctona puede influir negativamente en las propiedades sensoriales de estos productos. Por lo tanto, las cepas bacteriocinogénicas apropiadas para ser utilizadas como bioprotectores deberían provenir de la microbiota autóctona (Trmcic, et al., 2008).

Actualmente, en el Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche de la Facultad de Veterinaria, UdelaR, existe una línea de investigación en esta temática. Se cuenta con cepas nativas con potencial bacteriocinogénico, obtenidas a partir de muestras de leche y quesos artesanales de la zona de Colonia, Uruguay, entre las que se encuentra *Lactococcus lactis* autóctono GU967439 (Fraga, et al., 2013). Así, en el presente trabajo se propuso evaluar el efecto antilisterial y las propiedades sensoriales en quesos tipo Cuartirolo elaborados con *Lactococcus lactis* autóctono productor de bacteriocinas como cultivo adjunto.

## Materiales y Métodos

El desarrollo de este trabajo tuvo lugar en el Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche de Facultad de Veterinaria, UdelaR. Los quesos experimentales se elaboraron en la planta piloto del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) y el estudio de las características sensoriales en el Departamento de Productos Lácteos, Cárnicos, Hortifrutícolas y de la Colmena (LACAM) del LATU.

### Diseño experimental

Se realizaron dos repeticiones de las elaboraciones de quesos. En cada una de ellas se utilizaron dos tratamientos: quesos elaborados con *L. lactis* autóctono ( $2.5 \times 10^{10}$  ufc/g) como cultivo adjunto (al que se denominó T1 o Queso Lactis: QL) y el tratamiento control donde no se lo incluyó (llamado: T2 o Queso Control: QC). La subdivisión de los lotes para la evaluación del efecto antilisterial (*L. innocua* en una concentración:  $10^3$  ufc/g), detección *in vitro* de actividad bacteriocinogénica y evaluación sensorial de los quesos se indican en la **Figura 1**. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado siguiendo el mismo proceso de elaboración.

### Cepas bacterianas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Como cultivo *starter* se utilizó la cepa comercial de *Streptococcus thermophilus* (Lyofast ST 060°, Sacco, Italia). Se mantuvo almacenado en su envase original a -20 °C hasta el

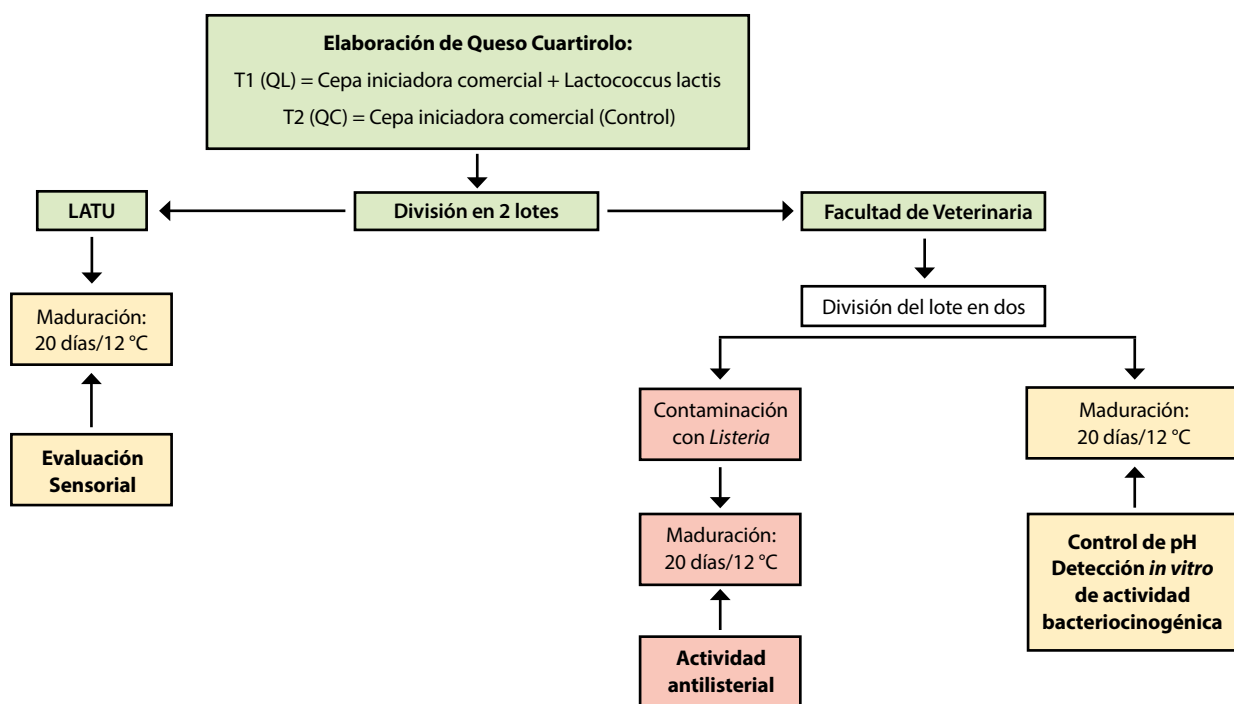


Figura 1. Diseño experimental: tratamientos y división de lotes de queso tipo Cuartirolo para sus posteriores evaluaciones.

momento de su utilización. Como medio de cultivo en los ensayos *in vitro* se utilizó M17 (Oxoid, UK) suplementado con lactosa (Merck) al 10% (p/v) incubado a 42 °C en aerobiosis (Mathot, et al., 2003). A su vez, como cultivo adjunto fue utilizado *Lactococcus lactis* autóctono GU967439, que presenta comprobado poder bacteriocinogénico y fue aislado de leche cruda utilizada para la elaboración de quesos artesanales en la zona de Colonia (Fraga, et al., 2013). Fue mantenido congelado a -80 °C en caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS, Difco, USA) suplementado con glicerol (15%, v/v). En este caso el medio de cultivo en los ensayos *in vitro* fue caldo MRS (Difco, USA) incubado a 30 °C por 48 h en condiciones de microaerofilia (en jarra provista con una vela) establecidas por ensayos previos en nuestro laboratorio.

Para los ensayos de inhibición *in vitro* se utilizó el método “well diffusion” (Fraga, et al., 2008) con los indicadores: *Listeria innocua* (ATCC 33090) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111). Brevemente, para el crecimiento de estos microorganismos se utilizó caldo infusión cerebro corazón (BHI HiMedia®, India) suplementado con 0,6% (p/v) de extracto de levadura (HiMedia®, India) e incubado a 37 °C por 24 h en aerobiosis. La evaluación de inhibición *in vitro* se realizó con BHI con Agar (1,5% p/v, HiMedia®, India) suplementado con 0,6% (p/v) de extracto de levadura (BHIA con extracto de levadura), el cual, una vez inoculado con el indicador correspondiente, se sembró en doble capa en placa de Petri, de acuerdo a las condiciones que se mencionan a continuación, y se incubó a 37 °C por 24 h en aerobiosis.

### Actividad antimicrobiana *in vitro*

Previo aplicación del *Lactococcus lactis* en la elaboración de los quesos se verificó su capacidad antagonista *in vitro*, por el método “agar spot test” (Fraga, et al., 2005) utilizando como

indicadores *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes*. Un volumen de 2,5 µL de un cultivo fresco de *L. lactis* fue inoculado (spotted) sobre la superficie de placas con agar MRS (Difco, USA) e incubado a 37 °C por 24 h en condiciones de microaerofilia. Se observó el desarrollo de colonias en la gota inoculada, luego se cubrió la superficie de la placa con BHI soft agar (0,8%), inoculado previamente con las bacterias indicadoras citadas en una concentración de 1x10<sup>8</sup> ufc/mL. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h en condiciones de aerobiosis. La inhibición del crecimiento bacteriano se determinó midiendo la zona de inhibición (halo) alrededor de las colonias que crecieron en la gota.

Para evaluar la naturaleza bioquímica de la/s sustancia/s antimicrobiana/s fue obtenido un sobrenadante libre de células (SLC) a partir de un cultivo de 48 h de *L. lactis* (10<sup>8</sup> ufc/mL), mediante centrifugación a 10000 RPM, 15 minutos a 4 °C. Alícuotas de este sobrenadante fueron posteriormente tratadas con: calor (10 minutos a 100 °C, neutralización con NaOH 1M, catalasa (1 mg/mL, Sigma, USA), pepsina (1 mg/mL, Sigma, USA), proteinasa K (1 mg/mL, Sigma, USA), α-quimiotripsina (1 mg/mL, Sigma, USA) y pronasa E (1 mg/mL, Sigma, USA) y analizado mediante la técnica “agar well diffusion” (Fraga, et al., 2008). Como control positivo del ensayo se inoculó 100µL de Nisina (Nisaplin®, Danisco) en una concentración de 100mg/mL. Como control negativo se utilizó el mismo volumen de MRS (Difco, USA) neutralizado con NaOH 1M. Este ensayo se realizó por duplicado. De forma similar y con la finalidad de descartar actividad antilisterial por la cepa comercial de *Streptococcus thermophilus*, se evaluó su capacidad antagonista *in vitro* por el método “agar spot test”. Finalmente, para determinar la compatibilidad entre las cepas que se utilizarían en la elaboración de queso se evaluó *in vitro* la actividad de la bacteriocina producida por *L. lactis* sobre el cultivo comercial, utilizando el método “agar well diffusion” (Fraga, et al., 2008).

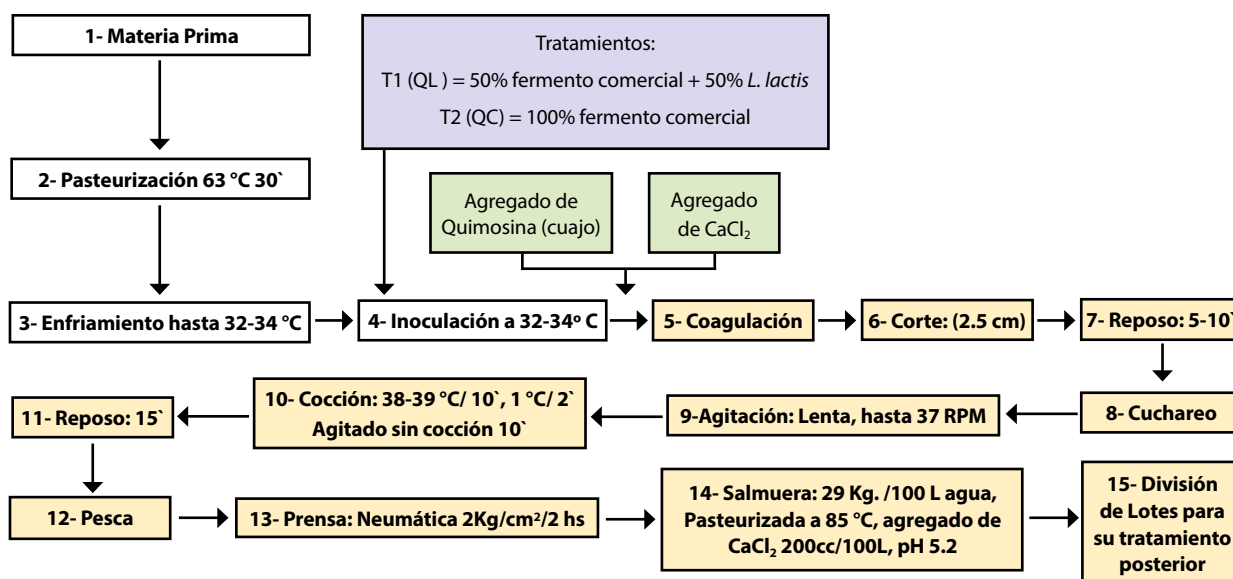


Figura 2. Flujograma general de elaboración de quesos tipo Cuartirolo.

## Curva de crecimiento, capacidad de fermentación y efecto inhibitorio de *L. lactis* en leche

Mediante curvas de crecimiento se determinó el tiempo para obtener el mayor número de células viables utilizando como matriz leche (*reconstituted skim milk* – RSM, Conaprole®, Uruguay) conforme a lo indicado por Valbuena et al. (2008). Asimismo, se evaluó la capacidad de fermentación estudiando a diferentes tiempos el pH (pH-metro, Oakton® pH 5 Acorn series) y la acidez Dörnic (Pinto, et al., 1998). El efecto inhibitorio de *L. lactis* en leche se evaluó mediante ensayos de “agar well diffusion” con los sobrenadantes neutralizados obtenidos de muestras extraídas a las 12, 24 y 30 h de crecimiento. El ensayo se realizó por duplicado y la actividad inhibitoria frente a *Listeria innocua* (ATCC 33090) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111), la cual se expresó en mM midiendo el diámetro del halo de inhibición.

## Producción del cultivo de *L. lactis* para su aplicación en la elaboración de quesos

Se llevó a cabo en un fermentador Bioflo II (New Brunswick Scientific Co., INC. N.J., USA) de 1500 mL de capacidad operando en modo discontinuo en batch. Como medio de cultivo se utilizó leche en polvo descremada al 10% esterilizada (100 °C/30 minutos). La fermentación se llevó a cabo en 1100 mL de leche inoculada al 10% con un cultivo fresco (aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc/mL). El cultivo final fue incubado 30 °C por 15 h en condiciones de aireación, agitación (40 rpm) y pH libre (la temperatura y el tiempo fueron determinadas de acuerdo a las curvas de crecimiento realizadas anteriormente). Al finalizar la fermentación se determinó la biomasa obtenida mediante recuento en placas con agar MRS. El cultivo fue conservado en fase estacionaria a 5 °C hasta su utilización en la elaboración de queso tipo Cuarti-

rolo. Adicionalmente se tomó una muestra de dicho cultivo para determinar el efecto inhibitorio mediante ensayos de “agar well diffusion”. El ensayo se realizó por duplicado y la actividad inhibitoria se expresó en mM midiendo el diámetro del halo de inhibición.

Previo a la elaboración de los quesos se realizó el ajuste de dosis de los cultivos a utilizar en 40 L de leche. Para cumplir con el diseño experimental se utilizaron las siguientes dosis para cada tratamiento:

T1 (QL): Cultivo Comercial  $2,5 \times 10^{10}$  ufc + *L. lactis*  $2,5 \times 10^{10}$  ufc  
T2 (QC): Cultivo Comercial  $5 \times 10^{10}$  ufc

El inóculo del cultivo *starter* comercial se determinó de acuerdo a la información técnica de la empresa proveedora (Sacco, SRL), mientras que el inóculo del cultivo de *L. lactis* se calculó de acuerdo a los datos obtenidos anteriormente en el recuento en agar MRS.

## Elaboración de queso tipo Cuartirolo

Se utilizaron un total de 80 L de leche, que se dividieron en dos lotes de 40 L, uno para cada tratamiento: T1 y T2. La elaboración se realizó de acuerdo al estándar para queso tipo Cuartirolo (Figura 2).

Durante la elaboración de los quesos y luego de su maduración se retiraron muestras para análisis de calidad microbiológica y de composición. Los análisis y técnicas se especifican en la Tabla 1. Entre los análisis se incluyó la detección de *Listeria* sp. (APHA, 2001) para asegurar además su ausencia antes de inocular los quesos que serían contaminados.

## Contaminación con *Listeria innocua* y cuantificación en diferentes tiempos durante la maduración

Para la contaminación de los quesos se eligió *L. innocua* como alternativa a la utilización de *L. monocytogenes*. Su

	Composición	Fisicoquímicos	Microbiológicos	Otros
Leche cruda	Proteína Materia grasa, Lactosa Sólidos totales (Lactoscan SLP®)	Acidez Dörnic (Pinto, et al., 1998) pH (pH-metro, Oakton® pH 5 Acorn series) Densidad Prueba de Alcohol	Mesófilos aerobios totales Coliformes totales <i>Staphylococcus coagulasa positiva</i> (APHA, 2001)	Inhibidores, Galesloot (Pinto, et al., 1998) y Delvotest® SP-NT (Stead, et al., 2008)
Leche pasteurizada			Mesófilos aerobios totales Coliformes totales <i>Staphylococcus</i> coagulasa positiva (APHA, 2001)	Fosfatasa alcalina Phosphatesmo MI, MN® (Silva, et al., 1997)
Quesos	Materia Grasa Método Van Gulik (Pinto, et al., 1998)	pH (pH-metro, Oakton® pH 5 Acorn series) % de humedad (deseccación a peso constante en balanza OHAUS®).	<i>Listeria</i> sp. <i>Salmonella</i> sp. <i>Staphylococcus coagulasa positiva</i> Coliformes totales y termotolerantes (45 °C) (APHA, 2001)	

**Tabla 1.** Análisis de composición, fisicoquímicos y microbiológicos realizados durante la elaboración de quesos experimentales.

uso como sustituto es considerado un modelo adecuado ya descrito por algunos autores (Steg, et al., 1995, citados por Weiss y Hammes, 2005).

Luego de salir de la salmuera los quesos (T1 y T2) se contaminaron con *L. innocua* por inyección de un inóculo distribuido homogéneamente en todo el queso de manera de obtener 10<sup>3</sup> ufc/g en cada queso. Para esto se dividió la superficie de los quesos en cuadrícula y se inyectó cada cuadrante con 500 µL de una suspensión de *L. innocua*, descargando desde el interior hasta la superficie del queso. El inóculo se obtuvo mediante el crecimiento de *L. innocua* en BHI por 24 h a 37 °C en condiciones de aerobiosis y posteriores diluciones decimales hasta alcanzar dicha concentración.

Para la cuantificación de *L. innocua* muestras de queso (10 g) se tomaron por duplicado a las 2 h (t0), 7 días (t1) y 14 días (t2) posteriores a la inoculación. El conteo de *Listeria* sp. fue realizado de acuerdo a lo descrito por Rodríguez et al. (2005), mediante la realización de diluciones seriadas y siembra en placas con agar Palcam. Este es un medio selectivo y diferencial para el aislamiento y detección de *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria* sp. a partir de alimentos. Es recomendado por la American Public Health Association (APHA) para la detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos y por la International Dairy Federation (IDF/FIL) como medio en placa para la detección de las especies de *Listeria* en leche y productos lácteos (IDF/FIL, 1990; APHA, 2001).

### Determinación de pH y actividad bacteriocinogénica en quesos

Durante la maduración de los quesos (T1 y T2) mantenidos a 12 °C, se tomaron muestras del lote que no fue contaminado con *L. innocua* con el fin de determinar variaciones de pH y actividad bacteriocinogénica *in vitro*. Las muestras se tomaron en los mismos tiempos que se mencionaron anteriormente y se analizaron por duplicado para la detección de actividad bacte-

riocinogénica (Rodríguez, et al., 2005). Resumidamente, muestras de 5 g de cada queso fueron homogenizadas con 10 mL de una solución estéril de HCl 0,02N a 50 °C. El homogenizado fue centrifugado (12000 g, 20 min, 4 °C) y el sobrenadante obtenido se neutralizó con NaOH 1M. Un volumen de 100 µL del SLC fue inoculado en pocillos formados en placas con BHIA conteniendo 1x10<sup>8</sup> ufc/mL de *Listeria innocua*. Como control positivo se inoculó con 100 µL de Nisina (Nisaplin®, Danisco) en una concentración de 100 mg/mL. Como control negativo se utilizó el mismo volumen de MRS (Difco, USA) neutralizado con NaOH 1M. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h en aerobiosis. Luego de la incubación se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento y la actividad bacteriocinogénica se expresó en mM.

### Evaluación de características sensoriales de los quesos elaborados

Para establecer si la utilización del cultivo de *Lactococcus lactis* autóctono como cultivo adjunto afectó las características sensoriales de los quesos en estudio, se aplicó una técnica sensorial descriptiva. Se utilizaron muestras de cada lote de elaboración (aptas para consumo) que fueron maduradas en el LATU a 12 °C. Las mismas fueron evaluadas por un panel entrenado (10 jueces, seleccionados según ISO 22935-1:2009) (Lavanchy, et al., 1993; Béroder, et al., 1997; Montero, et al., 2005). Se evaluaron las características de textura: dureza manual, dureza en boca, elasticidad, friabilidad, solubilidad, impresión de humedad y adherencia. También se evaluaron los parámetros de sabor: intensidad de olor, intensidad de sabor, dulce, salado, amargo, ácido, picante y retrogusto. Todas ellas se evaluaron con escalas no estructuradas. Cada evaluador midió la intensidad de los 15 atributos para cada muestra de queso y se evaluaron como máximo tres muestras por sesión, realizando dos repeticiones por muestra. En cada sesión se utilizaron muestras de queso comerciales como control.

## Análisis estadístico

Para evaluar la actividad antilisterial durante la maduración, los resultados de los recuentos en placa se analizaron mediante ANOVA multifactorial considerando los efectos tiempo y tratamiento, utilizando el programa PAST (Hammer, et al., 2001).

Para determinar si la diferencia en las características sensoriales entre los tratamientos era significativa, se realizó para cada atributo una prueba t-Student para muestras independientes con INFOSTAT, V2008.

## Resultados

### Actividad antimicrobiana *in vitro*

*Lactococcus lactis* autóctono presentó actividad antimicrobiana *in vitro* con una media de diámetro de halo de inhibición de  $17,5 \pm 0,71$  mM y  $16,5 \pm 0,71$  mM frente a *L. monocytogenes* y *L. innocua*, respectivamente (Figura 3). En cambio *Streptococcus Thermophilus* no presentó actividad antimicrobiana frente a estos indicadores y se descartó que *L. lactis* inhibiera su crecimiento.

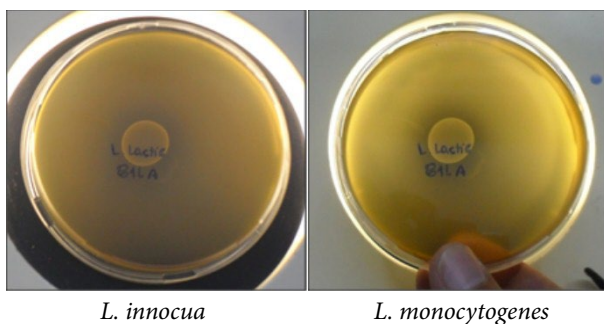
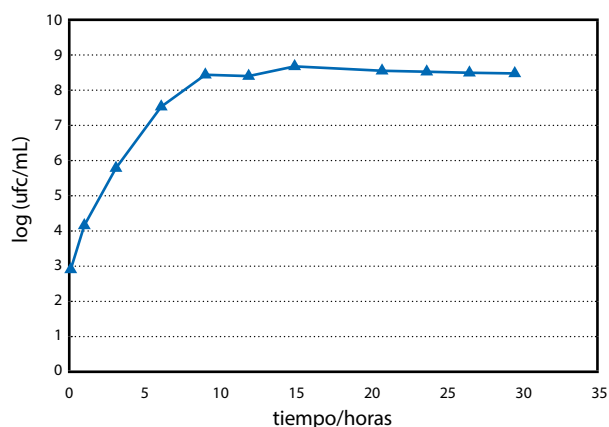


Figura 3. Actividad antagonista de *Lactococcus lactis* frente a los indicadores *L. innocua* y *L. monocytogenes*.

En la Tabla 2 se observan los resultados de la actividad antimicrobiana (frente a *L. innocua* y *L. monocytogenes*) en SLC del cultivo de *Lactococcus lactis* luego de ser sometido a diferentes tratamientos (calor, pH, diferentes enzimas proteolíticas y catalasa). El SLC presentó actividad luego del tratamiento térmico (100 °C por 10 min) posterior a su neutralización, así como frente al tratamiento con catalasa y pepsina. Por otra



parte, no se evidenció efecto inhibitorio luego del tratamiento con  $\alpha$ -quimotripsina, proteinasa K y proteasa.

Tratamiento del sobrenadante	Efecto inhibitorio <sup>a</sup>
<b>Calor</b>	
100 °C por 10 min	+
<b>pH</b>	
Neutralización	+
Sin neutralización	+
<b>Enzimas</b>	
Catalasa	+
Pepsina	+
$\alpha$ -Qimiotripsina	-
Proteasa	-
Proteinasa K	-
Control + b	+
Control - c	-

positivo +, PRESENCIA de halo de inhibición, negativo -, AUSENCIA de halo a Efecto inhibitorio sobre *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*  
b Nisina 100mg/mL  
c MRS estéril y neutralizado

Tabla 2. Efecto *in vitro* antimicrobiano frente a *L. innocua* y *L. monocytogenes* de SLC de *Lactococcus lactis* sometidos a diferentes tratamientos.

### Curva de crecimiento, capacidad de fermentación y efecto inhibitorio de *Lactococcus lactis* en leche

La curva de crecimiento y capacidad de fermentación de *Lactococcus lactis* en leche se muestran en el Gráfico 1. Allí se observa que a las 15 h de incubación el cultivo alcanzó su máxima concentración bacteriana ( $10^8$  ufc/mL), encontrán-

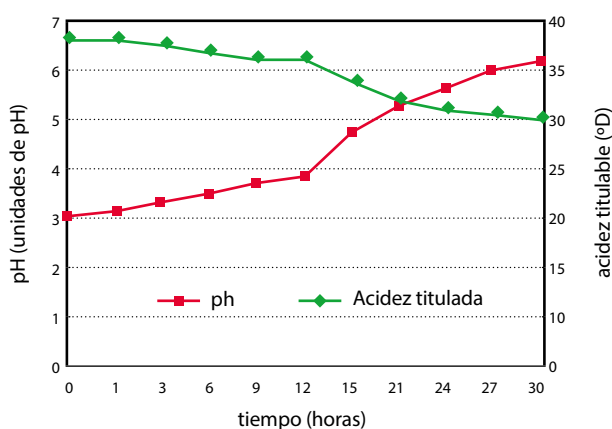


Gráfico 1. Curva de crecimiento (izquierda) y capacidad de fermentación (derecha) de *L. lactis* cultivado en leche a 30 °C.

dose en el inicio de la fase estacionaria, momento en el que su pH era 6,0 y su acidez titulable 20°D.

Durante su crecimiento en leche los SLC extraídos a las 12, 24 y 30 h de incubación evidenciaron por el método “agar well diffusion” halos de inhibición de:  $13,5 \pm 0,71$ ,  $15 \pm 1,41$  y  $17 \pm 1,41$ (mm), respectivamente.

En relación a los análisis de leche utilizada en la elaboración (ausencia de fosfatasa alcalina, recuento de mesófilos aerobios y coliformes totales), el proceso de pasteurización fue efectivo y, por tanto, su calidad final adecuada. Asimismo, los análisis de composición (MG y humedad) y microbiológicos de los diferentes lotes de queso tipo Cuartirolo cumplieron con los requisitos establecidos por el Reglamento Bromatológico Nacional (MSP, 1994) (resultados no mostrados). Adicionalmente, la ausencia de *Listeria* sp. en los quesos antes de su tratamiento permitió validar su cuantificación luego de la contaminación experimental.

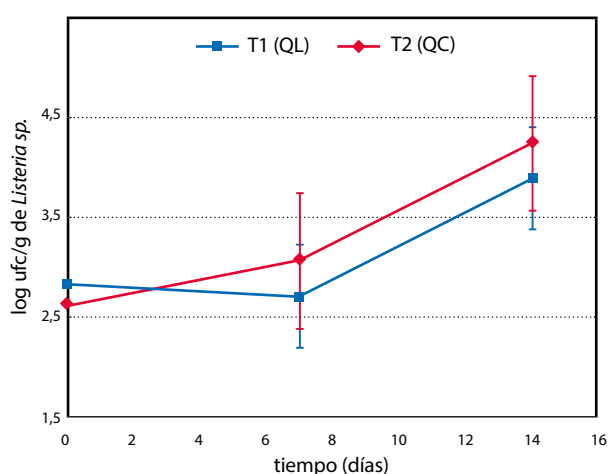
### Producción del cultivo adjunto de *Lactococcus lactis* para su aplicación en la elaboración de quesos

Se logró obtener una biomasa de  $7,5 \times 10^7$  ufc/mL de *L. lactis* en un volumen de 1100 mL de leche luego de la incubación a 35 °C/15 h.

Por otra parte, se determinó en este cultivo la presencia de efecto inhibitorio sobre *L. innocua*, obteniendo un halo de inhibición de promedio  $15 \pm 1,41$  mM de diámetro.

### Cuantificación de *Listeria innocua* durante la maduración de los quesos

La evolución de la concentración de *L. innocua* determinada mediante recuento en placa durante la maduración de los quesos se expresa en el **Gráfico 2**.



**Gráfico 2.** Cuantificación de *Listeria innocua* durante la maduración del queso tipo Cuartirolo almacenado a 12 °C. Queso elaborado con *Lactococcus lactis* GU967439 (T1) y Queso elaborado con cultivo comercial no bacteriocinogénico (T2).

Los análisis del recuento en placa mediante ANOVA multifactorial en relación al efecto tratamiento evidenciaron diferencias significativas en los recuentos de *L. innocua* in-

dependientemente del tiempo (T1:  $3,13 \pm 0,05$  Log ufc/g; T2:  $3,3 \pm 0,05$  Log ufc/g;  $p < 0,05$ ). Sin embargo, estos resultados difieren en menos de una unidad logarítmica (0,17 Log ufc/g).

Los resultados obtenidos en el recuento de *L. innocua* considerando el efecto tiempo, independientemente del tratamiento, presentaron diferencias significativas a partir de los 14 días, lo que indica que durante los primeros 7 días este crecimiento no es significativo (**Tabla 3**).

	t0 (2 hs)	t1 (7 d)	t2 (14 d)
Media (Log ufc/g)	2,72 <sup>a</sup>	2,89 <sup>a</sup>	4,06 <sup>b</sup>
Error estándar	0,06	0,06	0,06

\*Letras diferentes (entre pares de datos) indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

**Tabla 3.** Resultado del recuento de *L. innocua* durante la maduración del queso tipo Cuartirolo (efecto tiempo).

### Determinación de pH y actividad bacteriocinogénica en quesos

No existieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el pH durante la maduración de los quesos y la media para ambos tratamientos fue de  $5,01 \pm 0,01$  al final de la maduración. Los resultados de la detección de actividad bacteriocinogénica en los quesos se observan en la **Tabla 4**. Si bien el T1 presentó esta actividad (efecto inhibitorio) en los diferentes tiempos evaluados la misma fue disminuyendo y presentó el menor diámetro de halos de inhibición al final de la maduración ( $3 \pm 1,41$  mM).

	Halo de inhibición (mm) <sup>a</sup>		
	Tiempo 0 (2hs)	Tiempo 1 (7 días)	Tiempo 2 (14 días)
T1 (QL)	$13 \pm 1,41$	$10 \pm 0$	$3 \pm 1,41$
T2 (QC)	ND	ND	ND
Control +	$21 \pm 0,71$	$21 \pm 0,71$	$21 \pm 0,71$
Control -	ND	ND	ND

a Valores de la media de los diámetros de los halos de inhibición alrededor del pocillo inoculado  $\pm$  SD  
b ND- No se detectan halos

**Tabla 4.** Detección de actividad bacteriocinogénica in vitro en quesos (T1 y T2) durante la maduración.

### Comparación de características sensoriales de los quesos elaborados

Los resultados obtenidos de la evaluación sensorial y su posterior análisis estadístico se observan en la **Tabla 6**. No se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos en los atributos evaluados, a excepción del sabor salado. En ese caso la intensidad fue mayor en los quesos elaborados con *L. lactis* (QL).

Parámetros sensoriales	Tratamientos	
	T1 (QL)	T2 (QC)
<b>Atributos de textura</b>		
Dureza manual	3,2 <sup>a</sup>	3,5 <sup>a</sup>
Dureza en boca	2,8 <sup>a</sup>	3,1 <sup>a</sup>
Elasticidad	4,6 <sup>a</sup>	4,6 <sup>a</sup>
Friabilidad	2,8 <sup>a</sup>	3,0 <sup>a</sup>
Solubilidad	4,2 <sup>a</sup>	4,2 <sup>a</sup>
Impresión de humedad	3,9 <sup>a</sup>	4,0 <sup>a</sup>
Adherencia	3,4 <sup>a</sup>	3,2 <sup>a</sup>
<b>Atributos de sabor</b>		
Intensidad de olor	2,6 <sup>a</sup>	2,8 <sup>a</sup>
Intensidad de sabor	3,6 <sup>a</sup>	3,3 <sup>a</sup>
Dulce	0,8 <sup>a</sup>	0,6 <sup>a</sup>
Salado	3,8 <sup>a</sup>	3,0 <sup>b</sup>
Amargo	1,0 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>
Ácido	2,0 <sup>a</sup>	2,0 <sup>a</sup>
Picante	0,5 <sup>a</sup>	0,5 <sup>a</sup>
Retrogusto	2,1 <sup>a</sup>	2,1 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes (entre pares de datos), indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

**Tabla 5.** Evaluación sensorial de quesos tipo Cuartirolo.

## Discusión

### Actividad antimicrobiana in vitro de *Lactococcus lactis*

Los resultados de la actividad antimicrobiana *in vitro* de *Lactococcus lactis* GU967439 indicaron que presentó actividad antagonista frente a los indicadores *L. innocua* y *L. monocytogenes*, dado que se observó un halo de inhibición al crecimiento de ambos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Bromberg et al. (2005). Esta actividad puede deberse a diferentes factores (producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno e incluso bacteriocinas) por lo que se caracterizó la naturaleza del efecto.

Los resultados indicaron que el SLC de *L. lactis* GU967439 mantuvo su efecto inhibitorio cuando se aplicó calor, se neutralizó con NaOH 1M y se trató con catalasa y pepsina. La estabilidad térmica es una propiedad común en las bacteriocinas de BAL que tienen bajo peso molecular y estructura poco compleja (probablemente sin estructura terciaria) (Barba y Piard, 1993; González, et al., 1994; Todorov y Dicks, 2005).

A su vez, es una característica primordial que los compuestos utilizados como bioconservantes soporten etapas de calentamiento (pasteurización y esterilización) que son comunes en la industria láctea.

Recientemente, Lu et al. (2014) han demostrado la termoestabilidad de una bacteriocina producida por *Lactobacillus casei* (caseicina TN-2) que resistió tratamiento térmico de 121 °C/20 min. Sin embargo, existen algunas bacteriocinas como lactococcina 972, producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IPLA 972, cuya termosensibilidad se ha demostrado (Turner, et al., 2013); también helveticina producida por *L. helveticus* J (Joerger y Klaenhammer, 1986), y lactococcina mMT05 (Ghraiiri, et al., 2004), lo cual puede deberse a que poseen mayor tamaño (péptidos superiores a 30 kDa) y, por tanto, una estructura proteica más compleja.

En la literatura se reporta que las bacteriocinas son generalmente estables a pH ácido o neutro, aunque existen excepciones. Así, por ejemplo, la solubilidad y estabilidad de la nisina decrece desde un pH óptimo de 2 a un pH de 6, lo que constituye un inconveniente tecnológico importante para su utilización en los alimentos no ácidos (carne, pescados enlatados y algunos derivados lácteos) (De Vuyst y Vandamme, 1994).

En este trabajo el SLC neutralizado y tratado con catalasa mantuvo la actividad antimicrobiana, lo que descarta que el efecto sea solo por la producción de ácido y peróxido de hidrógeno por parte de *Lactococcus lactis*. En contraposición, no se observó efecto antimicrobiano cuando el sobrenadante fue tratado con las enzimas  $\alpha$ -quimotripsina, proteinasa K y proteasa.

De acuerdo a la definición de bacteriocinas, la sensibilidad a proteasas es un criterio clave en la caracterización de un inhibidor. Como toda sustancia proteica, generalmente se inactiva por una serie de enzimas proteolíticas (tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina, pepsina, proteinasa K, etcétera). El comportamiento respecto a la sensibilidad frente a proteasa puede indicar la singularidad de una bacteriocina, ya que este tipo de sustancias de distintas bacterias varían en sensibilidad con diferentes enzimas proteolíticas (De Vuyst y Vandamme, 1994); es posible que la actividad antimicrobiana encontrada se deba también a la presencia de una o varias sustancias peptídicas.

Ortolani et al. (2010) caracterizaron la producción de bacteriocinas y sustancias similares de aislamientos de BAL provenientes de leche cruda y quesos blandos. En sus resultados indican que 18 correspondieron a *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, encontrándose en siete de ellos la presencia de genes que codifican para nisina. Como ya se mencionó esta es una bacteriocina de bajo peso molecular, producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, que se caracteriza por la presencia de aminoácidos inusuales (lantionina y metil-lantionina) que son los responsables de propiedades funcionales como la tolerancia a la acidez, termoestabilidad a bajo pH y específica acción bactericida (Stiles, 1993). Comportamiento similar presenta también la Lacticina 481 (De Vuyst y Vandamme, 1994). Por otra parte, la nisina se inactiva con  $\alpha$ -quimotripsina, pero mantiene su actividad luego del tratamiento con pepsina (De Vuyst y Vandamme, 1994), lo cual coincide con el comportamiento frente a estas enzimas que se observó en este trabajo. Por lo anterior podría inferirse que existe la producción de nisina por *L. lactis* GU967439, aunque son necesarios estudios complementarios para el aislamiento, purificación y caracterización molecular con la determinación de secuencia de genes de la/s bacteriocina/s.



## Curva de crecimiento en leche: capacidad de fermentación y efecto inhibitorio de *Lactococcus lactis*

Los resultados obtenidos en la curva de crecimiento en leche mostraron que el número máximo de células viables se obtuvo a las 15 h de incubación (8,72 log ufc/mL). Ese período se correspondería con el inicio de la fase estacionaria para este microorganismo.

La literatura indica que la biosíntesis de bacteriocinas y particularmente la nisina se desarrolla al final de la fase exponencial (Juncioni de Arauz, et al., 2009), por lo que se definió ese tiempo para la producción del cultivo a aplicar posteriormente en la elaboración del queso. De esa forma el inóculo de *Lactococcus lactis* repicado nuevamente en leche continuará en esa fase de crecimiento y produciendo la o las sustancias con actividad antimicrobiana. Además, lo antedicho se verifica también por los valores de pH y acidez en ese período. En las condiciones experimentales ensayadas, fue posible determinar la capacidad de fermentación para el cultivo y expresarla como una relación entre temperatura, tiempo y pH, que fue de 35 °C/15 horas/5,8, respectivamente.

El estudio realizado por Martínez (1996), utilizando *L. lactis* subsp. *lactis* IPLA 729, indica valores máximos de crecimiento (ufc/mL) que coinciden con la producción máxima de nisina medida en unidades arbitrarias (UA)/mL, cercanos a las 10 horas de incubación tanto en leche como en medio de cultivo M17. En este estudio se pudo observar en relación a la curva de crecimiento en leche que existió actividad antilisterial en todos los tiempos evaluados, lo que parece indicar que se mantiene incluso en la fase estacionaria del crecimiento de la bacteria.

## Efecto antilisterial durante la maduración del queso tipo Cuartirolo

En cuanto al recuento de *Listeria innocua* durante la maduración, se observa que existieron diferencias significativas entre ambos tratamientos. Durante los primeros siete días la concentración de *L. innocua* disminuyó en los quesos elaborados con *L. lactis* (0,10 Log ufc/g) en comparación con la dosis inicial. Sin embargo, a partir del día siete de maduración el comportamiento fue similar en ambos tratamientos, alcanzando a los 14 días una concentración superior a 3 Log ufc/g en ambos. Lo anterior coincide con lo reportado por Sulzer y Busse (1991) en un trabajo sobre maduración de quesos Camembert, quienes hallaron que el crecimiento de *L. monocytogenes* (SLCC 1694) no se vio afectado cuando se utilizó como cultivo adjunto *Lactococcus lactis* 1881 (productor de nisina) en una concentración de 10<sup>7</sup> ufc/g. Sin embargo, reportan que el crecimiento de *L. monocytogenes* fue completamente detenido cuando se lo utilizó como único starter. No obstante, existen estudios que han demostrado la habilidad de bacteriocinas, especialmente nisina, para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en alimentos (Ryser, 1999; Samelis, et al., 2003; Rodríguez, et al., 2005). Altos niveles de esta bacteriocina han corroborado su efecto contra *L. monocytogenes* en quesos blandos en períodos tan cortos como 24 h (Ryser, 1999). Asimismo, Cosentino et al. (2012) comprobaron el efecto contra *Listeria* de seis *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* aislados de alimentos lácteos artesanales en Italia. En sus resultados indican una reducción de 4 log

de ufc/mL en comparación con el control y 2 log de ufc/mL respecto al inóculo inicial de *L. monocytogenes*.

## Actividad bacteriocinogénica de *Lactococcus lactis* en quesos

En relación a la actividad bacteriocinogénica, los resultados de este estudio determinaron su existencia en los quesos elaborados con *L. lactis* (T1) durante toda la maduración. Sin embargo, este efecto fue disminuyendo a lo largo de la actividad (disminución de los diámetros de los halos de inhibición), lo que podría explicarse por una disminución en la concentración de la bacteriocina  $\gamma$ , por tanto, en la actividad de la sustancia responsable de ese efecto. Así Kim et al. (1997) señalaron que la producción de nisina es inhibida cuando llega a una alta concentración, aun cuando las células permanecen creciendo en el medio de cultivo. Además, esta reducción en la actividad inhibitoria podría estar relacionada con otros factores como la falta de nutrientes, la degradación de proteínas por peptidasas, la adsorción de la bacteriocina a la célula productora y/o los diferentes efectos sobre la producción debido a pH bajo, (Todorov y Dicks, 2005b; Todorov, et al., 2007; Juncioni de Arauz, et al., 2009 citados por Taheri, et al., 2012). Otro factor importante a considerar es que la bacteriocina presente una baja estabilidad y que la actividad antimicrobiana decaiga rápidamente.

Maisnier-Patin et al. (1992) estudiaron el efecto de inhibición de *Listeria monocytogenes* por BAL productoras de nisina en quesos Camembert. Estos autores encontraron que la concentración de nisina tanto en la cuajada como en el queso tuvo una producción paralela al desarrollo de *L. lactis*. Describen que la concentración de nisina fue máxima en la cuajada a las 9 h y luego disminuyó, lentamente durante 9 a 24 h y drásticamente en la maduración. En presencia de nisina *L. monocytogenes* disminuyó rápidamente entre las 6 a 24 h, a su vez el efecto de inhibición continuó hasta el final de la segunda semana de maduración en el interior de los quesos Camembert, llegando a una reducción de 3,3 log de ufc/g de *Listeria* con respecto al nivel inicial. No obstante, posteriormente este patógeno volvió a desarrollarse en los quesos, manteniéndose una diferencia de 2,4 log ufc/g entre los quesos elaborados con el cultivo productor de nisina y el control durante la maduración (seis semanas). En general, observaron que la nisina era efectiva cuando se inoculaba la leche destinada a la elaboración de queso, con una concentración de *L. monocytogenes* entre 10<sup>1</sup> y 10<sup>3</sup> ufc/mL. No obstante, cabe señalar que algunas propiedades bioquímicas del queso Camembert difieren a las del queso tipo Cuartirolo y podrían explicar el crecimiento posterior de *Listeria* en esos quesos. Por ejemplo, el pH en queso Camembert (maduración con hongos) se incrementa desde valores iniciales de 4,5 hasta 5,5 y 7,0 a los 15 y 35 días respectivamente (Liu y Puri, 2008). Mientras que en este trabajo los resultados obtenidos para la determinación de pH indican que los valores se mantuvieron cercanos a 5 en ambos tratamientos (pH inicial: 5,35 y a los 14 días pH: 5,0).

Estudios realizados por Dal Bello et al. (2012) sobre el efecto antilisterial de varios *Lactococcus lactis* autóctonos productores de diferentes bacteriocinas en quesos Cottage indican que el efecto se mantuvo en valores de pH: 6,5, 5,5 y 4,5 (aunque la magnitud en ese efecto presentó diferencias significativas de acuerdo a la bacteriocina). Estas variaciones deben ser consideradas en futuros estudios.

## Evaluación sensorial de quesos tipo Cuartirolo

No se hallaron diferencias significativas entre ambos tratamientos a excepción del sabor salado, que fue mayor en los quesos elaborados con *L. lactis* autóctono. En este sentido, Garde et al. (2005) reportan que no hubo diferencias significativas en la intensidad de aroma cuando utilizaron una cepa de *Lactococcus lactis* productora de bacteriocina como cultivo adjunto para elaborar quesos tipo Hispano, en comparación con el tratamiento control, lo que coincide con lo obtenido en este estudio. Por otra parte, los atributos de textura no presentaron diferencias significativas entre ambos tratamientos. Este resultado coincide con lo reportado por Ávila et al. (2005), quienes no hallaron diferencias significativas en los atributos de textura, en quesos tipo Hispano elaborados con *Lactococcus lactis* productor de bacteriocinas.

Con respecto al atributo de sabor salado, si bien el proceso de salmuera fue igual para ambos quesos, posiblemente hubo diferencias en su distribución. Dado que no se determinó el contenido de sal en los quesos no es posible discutir esta variable, la que debería ser considerada en futuros ensayos. No obstante, cabe destacar que el aumento del sabor salado en el queso elaborado con *Lactococcus lactis* (T1) podría ser un factor (concentración de cloruro de sodio) que interfirió también en el desarrollo de *Listeria innocua* en el producto.

## Conclusiones

Los resultados de este trabajo permitieron determinar que *Lactococcus lactis* GU967439 tiene actividad antagonista *in vitro* frente a *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes*, que coincide con una sustancia de naturaleza proteica tipo bacteriocina. Además, la actividad antilisterial de esta cepa se mantuvo durante su crecimiento en leche. Sin embargo, la aplicación del cultivo adjunto de *Lactococcus lactis* GU967439 en quesos tipo Cuartirolo no resultó efectiva para el control *Listeria innocua* en todo el periodo evaluado. Por último, la utilización de *Lactococcus lactis* autóctono en la elaboración de quesos tipo Cuartirolo no modificó las propiedades sensoriales del queso en las condiciones de este trabajo.

## Reconocimientos

Al equipo humano del laboratorio del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche por el apoyo en los análisis de laboratorio.

A FPTA (Fondo de promoción y Tecnología Agropecuaria de Uruguay) y a Comisión sectorial de Investigación Científica (CSIC) de UdelaR, por ser las fuentes de financiamiento con las que se viabilizó este estudio.

## Referencias

APHA, 2001. *Compendium of methods for microbiological examination of foods*. 4a.ed. Washington DC: APHA  
Albenzio, M., Corbo, M., Rehman, S., Fox, P., De Angelis, M., Corsetti, A., Sevi, A. y Gobetti, M., 2001. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk, or by

heating the curd in hot whey. En: *International Journal of Food Microbiology*, 67, pp.35-48.  
Alegria, A., Delgado, S., Roces, C., López, B. y Mayo, B., 2010. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. En: *International Journal of Food Microbiology*, 143, pp.61-66.  
Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A. y Valdivia, E., 2005. Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. En: *Meat Science*, 71, pp.549-556.  
Ávila, M., Garde, S., Gaya, P., Medina, M. y Nuñez, M., 2005. Influence of a bacteriocin-producing lactic culture on proteolysis and texture of Hispánico cheese. En: *International Dairy Journal*, 15, pp.145-153.  
Ayad, E.H.E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H. y El-Soda, M., 2004. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. En: *Food Microbiology*, 21, pp.715-725.  
Balciunas, E. M., Martinez, F. A. C., Todorov, S. D., de Melo Franco, B. D. G., Converti, A., & de Souza Oliveira, R. P., 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. En: *Food Control*, 32, pp.134-142.  
Barba, J.L. y Piard, J.C., 1993. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. En: *Applied and Environmental Microbiology*, 59, pp.1416-1422.  
Bérodier, F., Lavanchy, P., Zannoni, M., Casals, J., Herrero, L. y Adamo, C., 1997. Guide d'Évaluation Olfacto-Gustative des Fromages à Pâte Dure et Semi-dure. En: *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 30, pp.653-664.  
Bromberg, R., Moreno, I., Delboni, R.R., Cintra, H.C. y Oliveira, P.T.C., 2005. Characteristics of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* CTC 204 and the effect of this compound on the mesophilic bacteria associated with raw beef. En: *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, pp.351-358.  
Cosentino, S., Fadda, M., Deplano, M., Melis, R., Pomata, R. y Pisano, M.B., 2012. Antilisterial activity of nisin-like bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from traditional Sardinian dairy products. En: *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, ID 376428. doi:10.1155/2012/376428  
Cruz-Chamorro, L.; Puertollano, M.A.; Puertollano, E.; Álvarez de Cienfuegos, G.; de Pablo, M. 2006. *In vitro* biological activities of magainin alone or in combination with nisin. En: *Peptides* 27 (6):1201-1209.  
Chen, H. y Hoover, D.G., 2003. Bacteriocins and their food applications. En: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, pp.82-100.  
Dal Bello, B., Coccolin, L., Zeppa, G., Field, D., Cotter, P. y Hill, C., 2012. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. En: *International Journal of Food Microbiology*, 153, pp.58-65.  
Devlieghere, F., Vermeiren, L. y Debevere, J., 2004. New preservation technologies and limitations. En: *International Dairy Journal*, 14, pp.273-285.  
De Vuyst, L. y Leroy, F., 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. En: *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, pp.194-199.

- De Vuyst, L. y Vandamme, E., 1994. *Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and application*. London: Chapman & Hall, Ltd.
- Fraga, M., Perelmuter, K., Delucchi, L., Cidade, E. y Zunino, P., 2008. Vaginal lactic acid bacteria in the mare: evaluation of the probiotic potential of native *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp. strains. En: *Antonie van Leeuwenhoek*, 93, pp.71-78.
- Fraga, M., Perelmuter, K., Giacaman, S., Zunino, P. y Carro, S., 2013. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from Uruguayan artisan cheese. En: *Food Science and Technology*, 33, pp.801-804.
- Fraga, M., Scavone, P. y Zunino, P., 2005. Preventive and therapeutic administration of an indigenous *Lactobacillus* sp. strain against *Proteus mirabilis* ascending urinary tract infection in a mouse model. En: *Antonie van Leeuwenhoek*, 88, pp.25-34.
- Gandhi, M. y Chikindas, M.L., 2007. Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. En: *International Journal of Food Microbiology*, 113, pp.1-15.
- Garde, M., Ávila, M., Medina, M. y Núñez, M., 2005. Influence of a bacteriocin producing lactic culture on the volatile compounds, odour and aroma of Hispánico cheese. En: *International Dairy Journal*, 15, pp.1034-1043.
- González, B., Arca, P., Mayo, B. y Suarez, J.E., 1994. Detection, Purification, and Partial Characterization of plantaricin C, a bacteriocin produces by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. En: *Applied and Environmental Microbiology*, 60, pp.2158-2163.
- Ghrai, T., Frere, J., Berjeaud, J.M. y Manai, M., 2004. Lactococcin mMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* isolated from rigouta cheese. En: *International Journal of Food Microbiology*, 105, pp.389-398.
- Hammer, Ø., Harper, D.A. y Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. En: *Paleontología Electrónica*, 4, pp.1-9.
- Hartmann, H., Wilke, T. y Erdmann, R., 2011. Efficacy of bacteriocin-containing cellfree culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. En: *International Journal of Food Microbiology*, 146, pp.192-199.
- International Dairy Federation, 1990. *Milk and milk products detection of Listeria monocytogenes. Provisional recommended method 143*. Bruselas: IDF.
- International Organization for Standardization ISO 22935-1:2009 (IDF 99-1:2009). *Milk and milk products -- Sensory analysis -- Part 1: General guidance for the recruitment, selection, training and monitoring of assessors*. Génova: ISO.
- Joerger, M. y Klaenhammer, T., 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. En: *Journal of Bacteriology*, 167, pp.439-446.
- Juncioni de Arauz, L., Faustino Jozala, A., Gava Mazzola, P. y Vessoni Penna, T., 2009. Nisin biotechnological production and application: a review. En: *Trends in Food Science & Technology*, 20, pp.146-154.
- Lavanchy, P., Berodier, F., Zannoni, M., Noël, Y., Adamo, C., Squella, J. y Herrero, L., 1993. L'Evaluation Sensorielle de la Texture des Fromages à Pâte Dure ou Semi-Dure. Etude Interlaboratoires. En: *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 26, pp.59-68.
- Lundén, J., Tolvanen, R. y Korkeala, H., 2004. Human Listeriosis Outbreaks Linked to Dairy Products in Europe. En: *Journal of Dairy Science*, 87, pp.E6-E11.
- Lü, X., Hu P., Dang, Y. y Liu, B., 2014. Purification and partial characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* TN-2 isolated from fermented camel milk (Shubat) of Xinjiang Uygur Autonomous region, China. En: *Food Control*, 43, pp.276-283.
- Maisnier-Patin, S.; Deschamps, N.; Tatini, S.R.; Richard, J., 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. En: *Lait*, 72, pp.249-263.
- Ministerio de Salud Pública (MSP), 1994. *Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto N° 315/994 2ª ed.* Montevideo: IMPO, CD ROM.
- Patin, S., Deschamps, N., Tatini, S.R. y Richard, J., 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. En: *Lait*, 72, pp.249-263.
- Martínez, B., 1996. *Bacteriocinas de Lactococcus lactis aislados de quesos asturianos: nisina z y lactococina 972*. Asturias: Universidad de Oviedo. (Tesis doctoral)
- Mathot, A., Beliard, E. y Thuault, D., 2003. *Streptococcus thermophilus* 580 Produces a Bacteriocin Potentially Suitable for Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Hard Cheese. En: *Journal of Dairy Science*, 86, pp.3068-3074.
- Mendonça, P., Martins, L., Tassinari, M., Keizo, A., Nogueira, G. y Nero, L., 2010. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. En: *LWT-Food Science and Technology*, 43, pp.1320-1324.
- Montero, H., Aranibar, G., Cañameras, C. y Castañeda, R., 2005. Metodología para la caracterización de quesos argentinos. En: INTI-Lácteos. En: *JASLIS 2005, Argentina (6-8 de septiembre de 2005)*. Buenos Aires: [s.n.].
- Montville, T.J y Chen, Y., 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved question. En: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(5), pp.511-9
- Oppgård, C., Fimland, G., Thorbæk, L. y Nissen-Meyer, J., 2007. Analysis of the Two-Peptide Bacteriocins Lactococcin g and Enterocin 1071 by Site-Directed Mutagenesis. En: *Applied and Environmental Microbiology*, 73, pp.2931-2938.
- Ortolani, M.B.T., Moraes, P.M., Perin, L.M., Viçosa, G.N., Carvalho, K.G., Silva Junior, A y Nero, L.A., 2010. Molecular identification of naturally occurring bacteriocinogenic and bacteriocinogenic-like lactic acid bacteria in raw milk and soft cheese. En: *Journal of Dairy Science*, 93, pp.2880-2886.
- Osuntoki, A.A., Gbenle, G.O. y Olukoya, D.K., 2003. Evidence for chromosomal determination of fungicidal activity in strain of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus fermentum* isolated from fermented foods. En: *Folia Microbiologica*, 48, pp.56-58.
- Pinto, M., Vega y León, M. y Pérez, N., 1998. *Métodos de análisis de la leche y derivados*. Valdivia: Universidad Austral de Chile.
- Randazzo, C., Caggia, C. y Neviani, E., 2009. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. En: *Journal of Microbiology Methods*, 78, pp.1-9.
- Rodríguez, E., Calzada, J., Arqués, J.L., Rodríguez, J.M., Nuñez, M. y Medina, M., 2005. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* in *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

- O157:H7 in cheese. En: *International Dairy Journal*, 15, pp.51-57.
- Ryser, E.T., 1999. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in cheese and other fermented dairy products. En: Ryser, E.T. y Marth, E.H. (eds.). *Listeria, listeriosis and food safety*. New York: Marcel Dekker. pp.411-503.
- Samelis, J., Kakouri, A., Rogga, K., Savvaidis, I. y Kontominas, M., 2003. Nisin treatments to control *Listeria monocytogenes* post-processing contamination on Anthotyros, a traditional Greek whey cheese, stored at 4°C in vacuum packages. En: *Food Microbiology*, 20, pp.661-669.
- Silva, P., Pereira, D., Oliveira, L. y Costa Junior, L., 1997. *Físico-Química do leite e derivados. Métodos analíticos*. Minas Gerais: Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda. Juiz de Fora.
- Stead, S.L., Ashwin, H., Richmond, S.F., Sharman, M., Langeveld, P.C., Barendse, J.P., Stark, J. y Keely, B.J., 2008. Evaluation and validation according to international standards of the Delvotest® SP-NT screening assay for antimicrobial drugs in milk. En: *International Dairy Journal*, 18, pp.3-11.
- Stiles, M.E., 1993. Bacteriocins produced by *Leuconostoc* species. En: *Journal of Dairy Science*, 77, pp.2718-2724.
- Sulzer, G. y Busse, M., 1991. Growth inhibition of *Listeria* spp. on Camembert cheese by bacteria producing inhibitory substances. En: *International Journal of Food Microbiology*, 14, pp.287-296.
- Taheri, P., Samadi, N., Ehsani, M.R., Khoshayand, M.R. y Jamalifar, H., 2012. An evaluation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ST1 isolated from goat milk. En: *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, pp.1452-1462.
- Todorov, S.D. y Dicks, L.M.T., 2005. *Lactobacillus plantarum* isolates from molasses produces bacteriocins active against Gram-Negative bacteria. En: *Enzyme and Microbial Technology*, 36, pp.318-326.
- Todorov, S.D. y Dicks, L.M., 2005b. Optimization of bacteriocin ST311LD production by *Enterococcus faecium* ST311LD, isolated from spoiled black olives. En: *Journal of Microbiology*, 43, pp.370-374.
- Todorov, S.D., Nyati, H., Meincken, M. y Dicks, L.M., 2007. Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. En: *Food Control*, 18, pp.656-664.
- Turner, D., Lamosa, P., Rodríguez, A. y Martínez, B., 2013. Structure and properties of the metastable bacteriocin Lcn972 from *Lactococcus lactis*. En: *Journal of Molecular Structure*, 1031, pp.207-210
- Trmcic, A., Obermajer, T., Rogelj, I. y Bogovic Matijasic, B., 2008. Short communication: Culture-independent detection of lactic acid bacteria bacteriocin genes in two traditional Slovenian raw milk cheeses and their microbial consortia. En: *Journal of Dairy Science*, 91, pp.4535-4541.
- Valbuena, E., Barreiro, J., Sánchez, E., Castro, G., Kutchinskaya, V. Y Briñez, W., 2008. Predicción del crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en leche descremada estéril en función a la temperatura. En: *Revista Científica Facultad Ciencias Veterinarias-Universidad de Zulia- Venezuela FCV-LUZ*, 18, pp.745-758.
- Venema, K., Venema, G. y Kok, J., 1995. Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. En: *Trends in Microbiology*, 3, pp.299-304.
- Weiss, A. y Hammes, W., 2005 Lactic acid bacteria as protective cultures against *Listeria* spp. on cold-smoked salmon. En: *European Food Research and Technology*, 222, pp.343-346.
- Wouters, J.T., Ayad, E.H., Hugenholtz, J. y Smit, G., 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. En: *International Dairy Journal*, 12, pp.91-109.

# Selección de basidiomicetes nativos con capacidad de degradar xenobióticos usando el endosulfán como modelo

## Screening of native basidiomycete capable of degrading xenobiotics using endosulfan as a model

Rivero Machado, Anisleidy (1), Niell, Silvina (2), Heinzen, Horacio (3), Cesio, María Verónica (3), Cerdeiras, María Pía (4), Soubes, Matilde (4)

(1) Departamento de Microbiología, en Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Unidad Fray Bentos

(2) Polo Agroalimentario y Agroindustrial, CUP, UdelaR

(3) Departamento de Química Orgánica, Departamento de Química del Litoral, Facultad de Química, Universidad de la República, UdelaR

(4) Departamento de Biociencias, Cátedra de Microbiología, Facultad de Química, Universidad de la República, UdelaR.

Contacto: arivero@latu.org.uy

RECIBIDO: 5/8/2016 – APROBADO: 15/12/2016

### Resumen

La eliminación de contaminantes recalcitrantes es un problema medioambiental de gran importancia. En particular, salvo la incineración o el confinamiento no existen procedimientos estándar para la eliminación de compuestos organoclorados como PCBs, dioxinas, pesticidas clorados o contaminantes persistentes usados en el pasado que se encuentran como residuos en el ambiente o almacenados como desechos en grandes cantidades esperando su destrucción. La búsqueda de alternativas para solucionar estos problemas para los cuales Uruguay aún no tiene respuesta configura un desafío. La biotransformación de dichos compuestos por basidiomicetes es un camino poco explorado en la región, a pesar del desarrollo que tienen estas tecnologías en países europeos. El objetivo de este trabajo fue avanzar en ese sentido realizando un screening de basidiomicetes aislados en nuestro país para seleccionar aquellos capaces de degradar organoclorados, empleando como modelo el endosulfán, insecticida prohibido por la Comunidad Europea desde 2007 y en Uruguay desde 2011, muy usado en el cultivo de soja y del que existen depósitos que deben ser eliminados. Se evaluó la capacidad de estos hongos de biotransformar el endosulfán a moléculas no acumulables en el medio ambiente y los resultados de la biotransformación se siguieron por gC-ECD. Uno de los hongos estudiados, *Bjerkandera adusta*, fue capaz al cabo de 27 días de cultivo de degradar un 87% del endosulfán agregado.

**Palabras clave:** Biorremediación, hongos de la podredumbre blanca de la madera, cribado.

### Abstract

Removal of recalcitrant environmental pollutants is a major problem. In particular, there are no methods other than incineration or landfilling for the removal of organochlorine compounds like PCBs, dioxins and chlorinated pesticides. These were widely used in the past, but now are either found as contaminants in the environment or stored in large quantities where they constitute a big risk. The search for alternatives to solve this issue sets a challenge for environmental sustainability. Biotransformation by basidiomycetes to remediate contaminated sites is an unexplored path in the region, despite the development these technologies have in European countries. In order to select fungi capable of degrading persistent compounds into harmless ones, a screening of native basidiomycetes isolated from natural sources was performed. The insecticide endosulfan was used as model molecule; endosulfan was banned in the European Union in 2007 and in our country in 2011. It was widely used in soybean cultivation and there are tons stored waiting its destruction. Specific methodologies were developed for evaluation of the biotransformation and the results were followed by gC-ECD. One of the fungi studied, *Bjerkandera adusta*, was able to degrade 87% of the added endosulfan after 27 days of incubation.

**Keywords:** Bioremediation, white-rot fungi, screening.

## Introducción

La “revolución verde” no hubiera sido posible sin el uso de agroquímicos como el DDT o el paratión. Estos compuestos abrieron la posibilidad de una rápida expansión de la industria

y el negocio de la protección de cultivos por medios químicos. Pero, al mismo tiempo, se comenzaron a plantear serios problemas por la aparición de áreas altamente contaminadas por

dichos agroquímicos que no desaparecían y se acumulaban, constituyendo un riesgo para la salud y la vida silvestre. La atenuación natural que podría darse no se produce con la celeridad y eficacia suficientes para evitar los riesgos inherentes que poseen estos contaminantes para la salud humana o el medio ambiente, generando espacios contaminados a los que es necesario sanear para su recuperación (Tabak, et al., 1997). La acumulación de un compuesto en un sitio no es el único factor que define la contaminación de ese lugar. Existen contaminantes que no se degradan fácilmente por poseer estructuras químicas muy estables que permanecen en el ambiente por años y son incorporados a las cadenas alimenticias en un proceso llamado bioacumulación. En este proceso, concentraciones del orden de ppt (partes por trillón) de contaminantes no degradables en el ambiente se acumulan en tejidos adiposos de los distintos integrantes de la cadena hasta alcanzar concentraciones del orden de decenas de ppm (partes por millón) en aquellos animales que están en la cima de la cadena alimenticia (Pointing, 2001). Un ejemplo de compuestos recalcitrantes son los compuestos organoclorados como PCBs o dioxinas cloradas y en particular los insecticidas organoclorados (Keum y Li, 2004). El uso de estos compuestos está cada vez más restringido, pero existen algunos que aún se aplican o que se encuentran almacenados como materia prima que no pudo ser comercializada debido a nuevas restricciones de uso. Tal es el caso del endosulfán, que ha sido prohibido en la Unión Europea desde el año 2007 (Kumar y Philip, 2006) y en Uruguay desde el 2011 (Uruguay, 2011). Un inconveniente adicional que presenta el endosulfán es que su primer producto de descomposición, el sulfato de endosulfán, es más persistente que el propio endosulfán, y constituye el 90% del residuo al cabo de 11 semanas (Weir, et al., 2006). En Uruguay, el endosulfán se ha usado intensivamente (aproximadamente 200 ton/año). Aparte de ser un contaminante ubicuo, puede encontrarse inclusive en ganado vacuno (Mor y Ozmen, 2003), integrándose directamente a la cadena alimenticia del ser humano. Dos problemas aparecen en el horizonte para los cuales no hay respuesta en el país: por un lado, la contaminación de la biosfera y, por otro, la eliminación del agrotóxico almacenado. Estas problemáticas necesitan una solución común que pueda adaptarse a las condiciones particulares con un mínimo de intervención en el medio ambiente sin incorporar más contaminación. Condiciones no contaminantes se consiguen a través de procesos biotecnológicos entre los cuales se destaca la biorremediación o descontaminación biológica (Weir, et al., 2006; Mukherjee y Mittal, 2005; Kwon, et al., 2005; Moreno, et al., 2004). La biorremediación, o sea, la eliminación por medio de agentes biológicos de contaminantes ambientales constituye una alternativa para la solución de este problema. Es definitiva y no genera más contaminación.

La capacidad de algunos hongos para transformar una gran variedad de compuestos orgánicos y llevarlos hasta CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O ofrece un potencial indiscutible para su utilización en procesos de tratamiento de contaminaciones (Moreno, et al., 2004).

En especial, los hongos de la podredumbre blanca (PB) de la madera han demostrado una gran versatilidad. Dichos hongos son basidiomicetes, mayormente saprófitos, comunes en bosques, por ejemplo de pino, encino y eucaliptos (Christian, et al., 2005). Los hongos de la PB secretan una o más de las tres enzimas extracelulares oxidativas esenciales para la mineralización de lignina: lignina peroxidasa (LiPs), manganeso peroxidasa (MnPs) y lacasas. Este complejo sistema enzimático

extracelular es inespecífico y tiene potencial en la eliminación de xenobióticos con estructura química similar a la lignina (Pointing, 2001; Zhao, et al., 2014), tales como: compuestos aromáticos, nitroaromáticos, aromáticos policíclicos (benzo-pireno, fenantreno y pireno, entre otros), herbicidas, pesticidas, detergentes clorofenólicos, compuestos orgánicos clorados (pentaclorofenoles, cloroanilinas, bifenilos policlorados) y colorantes (Scheel, et al., 2000; Bending, et al., 2002; Hirai, et al., 2004; Levin, et al., 2004; Wen, et al., 2010; Kües, 2015) así como azocompuestos (Walter, et al., 2004; Shah y Nerud, 2002; Zheng y Obbard, 2002; Eichlerová, et al., 2002; Cohen, et al., 2002; Novotný, et al., 1999; Mester y Tien, 2000). Algunos basidiomicetes como algunas especies de los géneros *Trametes*, *Coriolus*, *Pleurotus*, *Pycnoporus*, *Bjerkandera* y *Phanerochaete* presentan también la capacidad de degradar colorantes artificiales (Korniłowicz-Kowalska y Rybczyńska, 2012).

En Uruguay existen diversos hongos de la podredumbre blanca. En la Cátedra de Microbiología general, Departamento de Biociencias de Facultad de Química, se ha reunido una colección de cepas, algunas nativas, otras de cultivo comercial, de las cuales no se conocen sus capacidades degradadoras de xenobióticos. Este trabajo plantea realizar una *screening* de estos hongos para evaluar su capacidad de biodegradar endosulfán como modelo de agroquímicos persistentes. Esto permitirá seleccionar basidiomicetes que serán la base de biorreactores (*biobeds*) para la descontaminación de sitios impactados o la degradación de contaminantes persistentes almacenados.

## Materiales y Métodos

### Microorganismos empleados en el estudio

Los basidiomicetes utilizados pertenecen a la colección del Departamento de Biociencias, Cátedra de Microbiología, Facultad de Química, UdelaR: *ganoderma resinaceum* (CCM7187), *Psilocybe cubensis* (CCM0417), *Trametes versicolor* (CCM0338), *Coriolus sp* (CCM0341), *Abortiporus biennis* (CCM0106), *Pleurotus cornucopiae* (CCM006), *Pycnoporus sanguineus* (CCM0374), *Bjerkandera adusta* (CCM0379), *Phanaerochaete chrysosporium* (CCM004), *Punctularia atropurpurascens* (CCM014), *gloeophyllum trabeum* (H2130). Las cepas son conservadas en glicerol a <5 °C.

### Medios de cultivo, reactivos y estándares

#### Medios de cultivo

- Agar Extracto de Malta (OXOID) con Remazole brilliant blue r/Poly-R 478 (0,2 g/L); Extracto de Malta (12,5 g/L) H<sub>2</sub>O Destilada c.s.p (1L).
- Yeast Nitrogen Base (YNB, DIFCO) con el agregado de glucosa con Remazole brilliant blue r/Poly-R 478 (0,2 g/L); 6,7 g (0,1L (10X)). Esterilizado por filtración. H<sub>2</sub>O Destilada c.s.p (1L); pH 4,5±0,2.
- Agar Extracto de Malta (MEA, OXOID) con Remazole brilliant blue r/Poly-R 478 (0,2 g/L); Extracto de malta (30,0 g/L); Peptona bacteriológica (3,0 g/L); Agar (15,0 g/L); H<sub>2</sub>O Destilada c.s.p (1 L); pH 5,5±0,2.

- Kimura Agar con Remazole brilliant blue r/Poly-R 478 (0,2 g/L): glucosa (20,0 g/L); Peptona bacteriológica (5,0 g/L); Extracto de levadura (2,0 g/L);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,0 g/L);  $\text{MgSO}_4$  (5 g/L), Agar (15,0 g/L),  $\text{H}_2\text{O}$  Destilada c.s.p (1 L); pH 5,5±0,2.
- Yeast Carbogen Base (YCB) de DIFCO con Remazole brilliant blue r/Poly-R 478 (0,2 g/L): Tartrato de amonio (1,2 mM) preparado según indicaciones del fabricante.
- Yeast Carbogen Base (YCB) de DIFCO con Remazole brilliant blue r/Poly-R 478 (0,2 g/L): Tartrato de amonio (30 mM) preparado según indicaciones del fabricante.

Los medios utilizados se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Los colorantes fueron esterilizados por filtración.

## Reactivos

Remazole brilliant blue r y Poly-R 478 fueron proporcionados por Sigma Aldrich, USA.

Sales:  $\text{MgSO}_4$  proporcionado por Merck (Darmstadt, germany).

## Estándares y solventes

Estándares de los pesticidas del estudio: endosulfán  $\alpha+\beta$  (> 99% de pureza), proporcionados por Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, germany, 99%).

Solventes orgánicos libres de residuos de pesticidas, calidad HPLC, fueron proporcionados por Merck (Darmstadt, germany).

Las soluciones Stock de 1000 mg/L fueron preparadas en hexano o acetato de etilo y conservadas a 4 °C. Para los ensayos realizados en los medios de cultivo se disolvieron las soluciones stock en dimetil sulfóxido.

## Selección de los basidiomicetes

### Preparación de los inóculos

Los inóculos se prepararon en Agar Extracto de Malta y se incubaron a  $28 \pm 2$  °C por siete días. Se extrajo con un sacabocado de 1 cm de diámetro del borde de la colonia y se inocularon placas de Petri con los medios de cultivos. Los cultivos se incubaron a  $28 \pm 2$  °C.

### Evaluación del crecimiento en presencia de endosulfán

Los hongos se hicieron crecer con 50 mg/kg de endosulfán en el medio YNB con y sin el agregado de glucosa. Se incubaron por 12 días a  $28 \pm 2$  °C. Se realizaron cinco mediciones del diámetro de la colonia en las tres réplicas realizadas.

Asimismo, se hicieron crecer con 50 mg/kg de endosulfán en el medio agar malta con y sin glucosa. Los cultivos se incubaron por 10 días a  $28 \pm 2$  °C. Se realizaron cinco mediciones del diámetro de la colonia, en las tres réplicas realizadas.

### Selección del medio de cultivo y estudio de la producción enzimática

Se estudió la capacidad de producir enzimas ligninolíticas de los hongos seleccionados previamente en los medios,

agar extracto de malta, MEA, YNB con glucosa e YCB con tartrato de amonio, a los cuales se les agregó RBB o Poly-R478 (Novotny, et al., 2004).

Se evaluó la capacidad que presentaron los hongos de decolorar los colorantes artificiales y se midieron los diámetros de crecimiento de la colonia y/o los halos de decoloración. Se tomaron tres medidas de la colonia formada o de la zona decolorada y se definió el promedio como el valor del diámetro correspondiente.

## Evaluación de la bioconversión

A partir de los cultivos en YNB con 1% de glucosa y 50 mg/kg de endosulfán se tomaron muestras a los 12 días de incubación. Las muestras consistieron en un segmento de 1 cm de diámetro de medio de cultivo tomado de la zona con micelio y un segmento del mismo tamaño de medio de cultivo sin micelio. Se evaluaron cinco placas de las cuales se sacaron dos muestras de cada zona. Se calculó el valor promedio.

## Determinación del porcentaje de endosulfán degradado por GC-ECD

Para la extracción de la muestra se adicionaron 4 mL de acetona que fueron homogenizados con la muestra durante cinco minutos en un vortex. La suspensión resultante fue centrifugada por 10 min a 3000 rpm. El sobrenadante se pasó por una columna con Sulfato de Magnesio y el eluido se evaporó bajo presión reducida. El residuo se retomó con 1 mL de una solución de bromofós 1,3 mg/kg en acetato de etilo. Dicho compuesto se empleó como estándar interno y se inyectaron las muestras en el cromatógrafo de gases con detector de captura electrónica (GC- ECD) SHIMADZU 17A, equipado con un inyector PTV y una Columna capilar Mega 60 (30 m, 0,32 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de grosor). La temperatura del detector fue de 280 °C. Se determinó el valor promedio y se calculó su desviación estándar relativa.

## Resultados

### Selección de basidiomicetes

El primer *screening* se realizó para evaluar la capacidad de crecer de los 11 hongos seleccionados con 50 mg/kg de endosulfán, tanto en presencia como ausencia de glucosa como se muestra en la **Tabla 1**. El cribado arrojó que existían cepas de basidiomicetes que presentaban la capacidad de crecer en presencia de endosulfán como única fuente de carbono presente en el medio de cultivo. Se pudo comprobar que ocho de los 11 hongos fueron capaces de crecer en presencia de endosulfán. Del total de los basidiomicetes evaluados se seleccionaron seis hongos que fueron los que mejor crecieron con endosulfán como única fuente de carbono. Se testó la capacidad de los basidiomicetes seleccionados de crecer en un medio complejo como el agar malta con y sin glucosa. Los resultados se muestran en la **Tabla 1**.

*Bjerkandera adusta* y *Abortiporus biennis* fueron los basidiomicetes que presentaron una mayor velocidad de crecimiento en presencia de endosulfán en todos los medios evaluados, por lo que fueron seleccionados. Asimismo, se

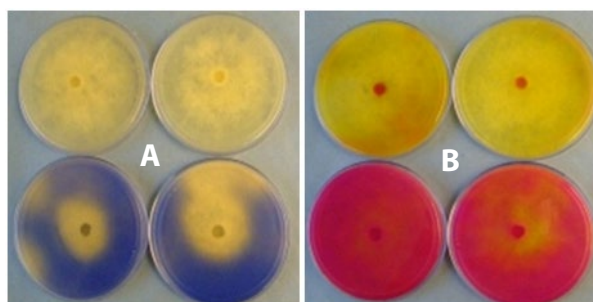
Hongo	Medio	Tamaño (diámetro)	Medio	Tamaño (diámetro)
<i>P. atropurpurascens</i>	YNB	8 mm	Malta	No crecimiento
	YNB + glu	8 mm	Malta + glu	No crecimiento
<i>P. chrysosporium</i>	YNB	12 mm	Malta	No crecimiento
	YNB + glu	14 mm	Malta + glu	No crecimiento
<i>A. biennis</i>	YNB	27 mm	Malta	18 mm
	YNB + glu	27 mm	Malta + glu	15 mm
<i>B. adusta</i>	YNB	38 mm	Malta	30 mm
	YNB + glu	40 mm	Malta + glu	25 mm
<i>T. versicolor</i>	YNB	9 mm	Malta	No crecimiento
	YNB + glu	8 mm	Malta + glu	No crecimiento
<i>P. sanguineus</i>	YNB	8 mm	Malta	No crecimiento
	YNB + glu	11 mm	Malta + glu	No crecimiento
<i>P. cubensis</i>	YNB	No crecimiento	ND	
	YNB + glu	No crecimiento	ND	
<i>Coriolus sp.</i>	YNB	9 mm	ND	
	YNB + glu	8 mm	ND	
<i>P. cornucopiae</i>	YNB	No crecimiento	ND	
	YNB + glu	No crecimiento	ND	
<i>G. ferreus</i>	YNB	9 mm	ND	
	YNB + glu	10 mm	ND	
<i>G. recinaceum</i>	YNB	No crecimiento	ND	
	YNB + glu	No crecimiento	ND	

**Tabla 1.** Medición del diámetro de la colonia (diámetro) de los basidiomicetes crecidos en Yeast Nitrogen Base (YNB) en presencia de 50 mg/kg de endosulfán, con o sin el agregado de glucosa (glu), al 1% al cabo de 12 días, y en Agar Malta (Malta) en presencia de 50 mg/kg de endosulfán, con o sin el agregado de glucosa (glu), al 1% al cabo de 10 días. ND: no determinado.

seleccionó *Punctularia atropurpurascens* como referencia por ser uno de los hongos que presentó crecimiento en al menos uno de los medios evaluados.

### Selección del medio de cultivo y estudio de la producción enzimática

En la **Figura 1** se observa cómo la decoloración a los tres días es parcial y a los seis días es total.



**Figura 1.** Decoloración de los colorantes Remazole-blue (A), y Poly-R (B) por *Abortiporus biennis* en el medio Agar Malta, a los tres (inferior) y seis (superior) días de incubación.

Para poder definir cuál era el medio de cultivo más adecuado se realizó un estudio de la producción del sistema ligninolítico en los medios de cultivo en estudio. Partiendo de la hipótesis de trabajo de que son estas enzimas las responsables de la degradación del compuesto, se realizaron ensayos con varios medios de cultivo buscando aquel que permitiera la mayor expresión enzimática, para realizar los estudios de bioconversión.

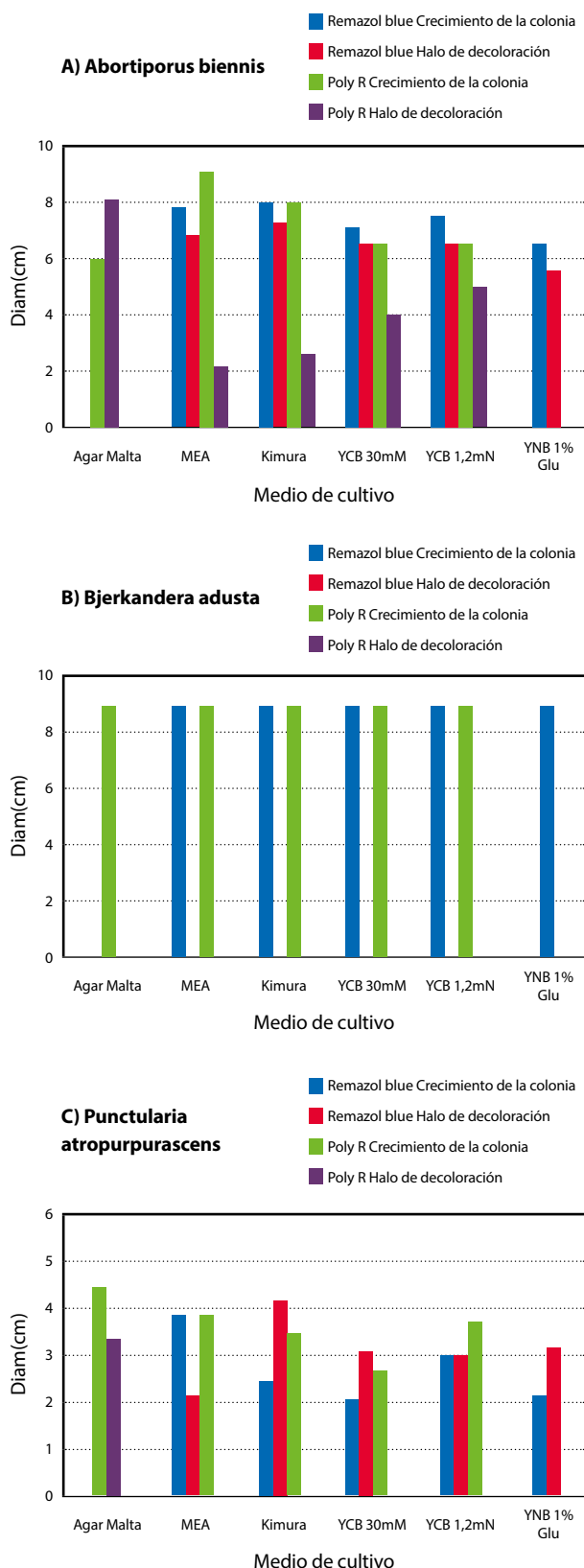
Como medida cualitativa de la producción de enzimas, se evaluó la capacidad de decoloración de determinados colorantes artificiales y al mismo tiempo se determinó su velocidad de crecimiento a través de la medición del diámetro de la colonia en diferentes condiciones nutricionales, en cuanto a la fuente de carbono y nitrógeno. Asimismo se evaluaron medios de composición definidos (medios sintéticos) y complejos (**Gráfico 1**). Se probaron los Basidiomycota que fueron seleccionados en el *screening*. *A. biennis* y *P. atropurpurascens* presentaron crecimiento en todos los medios ensayados y decoloraron los colorantes Remazole brilliant blue r y Poly-R 478 (gráfico 1A y 1B). *B. adusta* a los seis días no decoloró ninguno de los medios ensayados. Sin embargo, se continuó igualmente el estudio de este basidiomicete pues fue el que presentó la mayor velocidad de crecimiento.

De los medios evaluados, el medio Agar Malta es el medio que presentó mejores valores en cuanto a crecimiento y decoloración, por lo que sería un medio propicio para el estudio. El medio YNB con 1% de glucosa y MEA son los medios donde los basidiomicetes presentaron menor decoloración, la situación más crítica de las evaluadas. Por ello se seleccionó YNB+1% de glucosa para realizar el estudio de bioconversión.

### Bioconversión de endosulfán por *Bjerkandera adusta*

Tal como se describió en Materiales y Métodos, las placas crecidas con el basidiomicete en el medio YNB con 1% de glucosa y 50 mg/kg de endosulfán fueron evaluadas a los 12 días. Se realizó la medición del diámetro de la colonia y





**Gráfico 1.** Medición del crecimiento y del halo de decoloración de *Abortiporus biennis* (A), *Bjerkandera adusta* (B), *Punctularia atropurpurascens* (C) en los medios de cultivo: Agar Malta, MEA, Kimura, YCB (Tartrato de amonio 30 mm), YCB (Tartrato de amonio 1,2 mm), YNB (1% Glu).

se tomaron muestras para la evaluación de la biodegradación del pesticida en estudio. Las muestras fueron analizadas de forma tal de evaluar la bioconversión en la zona de crecimiento del basidiomicete y en zonas alejadas del mismo. Se realizó también una determinación de la biodegradación total al cabo de 27 días.

Se verificó que *B. adusta* es capaz de biotransformar endosulfán. Los porcentajes de bioconversión a los 12 días fueron del  $67 \pm 3\%$  y  $47 \pm 1\%$  en un área de la placa con micelio y sin micelio, respectivamente. Se transformó el compuesto en la zona debajo de la colonia del hongo así como en la zona sin micelio.

Luego de 27 días de incubación, *B. adusta* degrada el endosulfán en un  $83 \pm 7\%$ . La metodología para evaluar no solo el porcentaje de degradación de endosulfán sino también el porcentaje de aparición de los metabolitos producto de la biotransformación con significancia toxicológica ha sido previamente reportada por nuestro grupo (Rivero, et al., 2012). Es de destacar que se comprobó la no acumulación de endosulfán sulfato al final del ensayo de degradación (27 días).

## Discusión

### Selección de basidiomicetes

Las referencias bibliográficas permitieron seleccionar dentro de la colección de Basidiomycota de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química a 11 Basidiomycota que tenían la capacidad potencial de transformar compuestos xenobióticos (Lamar, 1992; Choi, et al., 2014; Jaszek, et al., 2006; Sarthima y Khammuang, 2013). El estudio demostró que los ocho basidiomicetes capaces de crecer en presencia del compuesto lo realizaban en presencia y/o ausencia de glucosa en el medio, y esto no necesariamente afectaba el tamaño de la colonia a un determinado tiempo de incubación, aunque sí la densidad de micelio de la misma al cabo del tiempo de cultivo. Estos resultados permiten evaluar la hipótesis de que el compuesto es utilizado por estas cepas como fuente de carbono, pues fueron capaces de crecer en un medio definido sin el agregado de fuente de carbono (YNB). En las condiciones ensayadas, *B. adusta* no necesariamente presenta un sistema ligninolítico activo, según descrito por Novotný et al. (2004). Estos resultados sugieren que pueden existir otras vías de degradación del endosulfán que no sean únicamente la degradación producida por las enzimas del sistema ligninolítico que se excretan al medio como parte del metabolismo secundario.

### Selección del medio de cultivo y estudio de la difusión enzimática

La presencia de uno u otro colorante no afectó el crecimiento de *B. adusta* y son comparables los crecimientos en los medios sin la presencia de colorantes a los observados cuando estos se habían agregado. Sin embargo, no se observó decoloración de ninguno de los dos colorantes en los distintos medios ensayados.

*A. biennis* y *P. atropurpurascens* presentaron crecimiento y decoloración de los colorantes en las condiciones de ensayo en todos los medios evaluados, observándose los mayores halos de decoloración para el medio extracto de malta. Por lo tanto, la capacidad de crecer en cada una de estas condiciones nutricionales permite seleccionar cualquiera de estos medios para evaluar la degradación de endosulfán. Por otro lado, el

medio YNB con 1% de glucosa y MEA son los medios donde estos basidiomicetes presentaron menor decoloración de los colorantes artificiales. Se verificó la capacidad de producción enzimática en el medio y su crecimiento en presencia de 50 mg/kg de endosulfán.

En general, se ha relacionado la capacidad degradativa de los hongos de la pudrición blanca con la actividad de su sistema enzimático ligninolítico; sin embargo, en numerosos trabajos se ha comprobado que estos hongos degradan xenobióticos bajo condiciones de cultivo no ligninolíticas y además se ha comprobado que muchos de ellos no son degradados por las enzimas ligninolíticas en condiciones *in vitro* (Karas, et al., 2011).

### Bioconversión de endosulfán por *B. adusta*

*B. adusta* fue capaz de biotransformar el endosulfán en las zonas con presencia de crecimiento activo y sin micelio en el medio, demostrando que existen procesos de difusión de enzimas o del compuesto en estudio. La ausencia de halo de decoloración para este hongo a los seis días y resultados obtenidos para esta misma especie (Korniłowicz-Kowalska y Rybczyńska, 2012) sugieren que, en estas condiciones, este basidiomicete necesita un mayor tiempo de cultivo para comenzar a excretar las enzimas extracelulares del sistema ligninolítico. Se conocen tres mecanismos enzimáticos principales empleados por los hongos de la podredumbre blanca de la madera para degradar contaminantes ambientales, dos de tipo oxidativo y uno reductivo: i) sistema de degradación de la lignina, que realiza ataques oxidativos a moléculas orgánicas por medio de radicales libres generados por las enzimas ligninolíticas peroxidasas; ii) fase I del metabolismo, mecanismo oxidativo en que intervienen las enzimas citocromo P-450 monooxigenasas, y iii) fase II del metabolismo donde un conjunto de enzimas cataliza reacciones de conjugación reduciendo los contaminantes (Christian, et al, 2005; Karas, et al, 2011). Esto ha sido reportado para otros hongos de la podredumbre blanca que han demostrado su capacidad de degradar endosulfán (Quintero Díaz, 2011). Por ejemplo, se comprobó que para *P. chrysosporium* en las etapas iniciales de degradación no están involucradas las enzimas ligninolíticas y se ha propuesto que las enzimas P-450s son las responsables de la degradación inicial de este insecticida (Kullman y Matsumura, 1996). Estos reportes podrían explicar el comportamiento de *B. adusta* evaluado en este trabajo.

### Conclusiones

De los 11 hongos evaluados, ocho son capaces de crecer en presencia de 50 mg/kg de endosulfán, llegando a crecer cuando el endosulfán es la única fuente de carbono. El medio YNB con 1% de glucosa es apropiado para evaluar el porcentaje de bioconversión de endosulfán por los basidiomicetes. Los basidiomicetes que presentaron mayor crecimiento en el medio YNB con y sin glucosa fueron *B. adusta* y *A. biennis*. A los 12 días de ensayo, en el medio YNB+1% de glucosa, *B. adusta* es capaz de transformar el endosulfán en un 67 y 46% debajo de la colonia y alejado de ella, respectivamente. Al cabo de 27 días degradó un 83% del total de endosulfán agregado. Este estudio comprueba que la biorremediación de compuestos

recalcitrantes, aromáticos o clorados por hongos nativos es una alternativa ambientalmente amigable como respuesta a una problemática seria y actual del país.

### Referencias

- Bending, g. D., Friloux, M. y Walker, A., 2002. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. En: *FEMS Microbiology Letters*, 212, pp.59-63.
- Cohen, R., Persky, L. Y Hadar, Y., 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. En: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, pp.582-594.
- Choi, Y., Seo, J., Lee, H., Yoo, J., Jung, J., Kim, J. Y Kim, g., 2014. Decolorization and detoxification of wastewater Containing industrial dyes by *Bjerkandera adusta* KUC9065. En: *Water, Air, and Soil Pollution*, 225, pp.1801-1801.
- Christian, V., Shrivastava, R., Shukla, D., Modi, H. y Vyas, B., 2005. Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: enzymology and mechanisms involved. En: *Indian J Exp Biol*, 43, pp.301-302.
- Eichlerová, I., Homolka, L. y Nerud, E., 2002. Decolorization of synthetic dyes by *Pleurotus ostreatus* isolates differing in ligninolytic properties. En: *Folia Microbiologica*, 47, pp.691-695.
- Hirai, H., Nakanishi, S. y Nishida, T., 2004. Oxidative dechlorination of methoxychlor by ligninolytic enzymes from white-rot fungi. En: *Chemosphere*, 55, pp.641-645.
- Jaszek, M., grzywnowicz, K., Malarczyk, E. y Leonowicz, A., 2006. Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of white rot fungi: *Trametes versicolor* and *Abortiporus biennis* to paraquat-caused oxidative stress conditions. En: *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85, pp.147-154.
- Karas, P. A., Perruchon, C., Exarhou, K., Ehaliotis, C. y Karpouzias, D. g., 2011. Potential for bioremediation of agro-industrial effluents with high loads of pesticides by selected fungi. En: *Biodegradation*, 22, pp.215-228.
- Keum, Y. S. y Li, Q. X., 2004. Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. En: *Chemosphere*, 56, pp.23-30.
- Korniłowicz-Kowalska, T. y Rybczyńska, K., 2012. Decolorization of Remazol Brilliant Blue (RBBR) and Poly R-478 dyes by *Bjerkandera adusta* CCBAS 930. En: *Central European Journal of Biology*, 7, pp.948-956.
- Kües, U., 2015. Fungal enzymes for environmental management. En: *Current Opinion in Biotechnology*, 33, pp.268-278.
- Kullman, S. W. y Matsumura, F., 1996. Metabolic pathways utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of the cyclodiene pesticide endosulfan. En: *Applied and Environmental Microbiology*, 62, pp.593-600.
- Kumar, M. y Philip, L., 2006. Enrichment and isolation of a mixed bacterial culture for complete mineralization of Endosulfan. En: *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 41, pp.81-96.
- Kwon, g.-S., Sohn, H.-Y., Shin, K.-S., Kim, E. y Seo, B.-I., 2005. Biodegradation of the organochlorine insecticide, endosulfan, and the toxic metabolite, endosulfan sulfate, by *Klebsiella oxytoca* KE-8. En: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, pp.845-850.

- Lamar, R. T., 1992. The role of fungal lignin-degrading enzymes in xenobiotic degradation. En: *Current Opinion in Biotechnology*, 3, pp.261-266.
- Levin, L., Papinutti, L. y Forchiassin, F., 2004. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. En: *Bioresource Technology*, 94, pp.169-176.
- Mester, T. y Tien, M., 2000. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. En: *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46, pp.51-59.
- Mor, F. y Ozmen, O., 2003. Acute endosulfan poisoning in cattle. En: *Veterinary and Human Toxicology*, 45, pp.323-324.
- Moreira, M., Palma, C., Mielgo, I., Feijoo, G. y Lema, J., 2001. In vitro degradation of a polymeric dye (Poly R-478) by manganese peroxidase. En: *Biotechnology and Bioengineering*, 75, pp.362-368.
- Moreno, C. M., Becerra, A. G. y Santos, M. J. B., 2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. En: *Rev Iberoam Micol*, 21, pp.103-120.
- Mukherjee, I. y Mittal, A., 2005. Bioremediation of endosulfan using *Aspergillus terreus* and *Cladosporium oxysporum*. En: *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75, pp. 1034-1040.
- Novotný, Č., Erbanová, P., Šašek, V., Kubátová, A., Cajthaml, T., Lang, E., Krahl, J. y Zdražil, F., 1999. Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. En: *Biodegradation*, 10, pp.159-168.
- Novotný, Č., Svobodová, K., Erbanová, P., Cajthaml, T., Kasinath, A., Lang, E. y Šašek, V., 2004. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. En: *Soil Biology and Biochemistry*, 36, pp.1545-1551.
- Pointing, S., 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. En: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, pp.20-33.
- Quintero Díaz, J. C., 2011. Revisión: degradación de plaguicidas mediante hongos de la pudrición blanca de la madera. En: *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 64, pp.5867-5882.
- Rivero, A., Niell, S., Cesio, V., Cerdeiras, M. P. y Heinzen, H., 2012. Analytical methodology for the study of endosulfan bioremediation under controlled conditions with white rot fungi. En: *Journal of Chromatography B*, 907, pp.168-172.
- Sarnthima, R. y Khammuang, S., 2013. Laccase production by *Pycnoporus sanguineus* grown under liquid state culture and its potential in remazol brilliant blue R decolorization. En: *International Journal of Agriculture and Biology*, 15, pp.215-222.
- Scheel, T., Höfer, M., Ludwig, S. y Hölker, U., 2000. Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. En: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, pp.686-691.
- Shah, V. y Nerud, F., 2002. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. En: *Canadian Journal of Microbiology*, 48, pp.857-870.
- Tabak, H., Govind, R., Fu, C. y Gao, C., 1997. Protocol for determining bioavailability and biodegradation kinetics of organic soil pollutants in soil systems to enhance bioremediation of polluted soil sites. En: *Bioremediation Protocols*, 2, pp.223-240
- Uruguay. Resolución 056. mgAP, de 17 de enero de 2011. *Disposiciones sobre aplicación de productos fitosanitarios formulados a base de ENDOSULFAN*.
- Walter, M., Boul, L., Chong, R. y Ford, C., 2004. Growth substrate selection and biodegradation of PCP by New Zealand white-rot fungi. En: *Journal of Environmental Management*, 71, pp.361-369.
- Weir, K. M., Sutherland, T. D., Horne, I., Russell, R. J. y Oakeshott, J. G., 2006. A single monooxygenase, ese, is involved in the metabolism of the organochlorides endosulfan and endosulfate in an *Arthrobacter* sp. En: *Applied and Environmental Microbiology*, 72, pp.3524-3530.
- Wen, X., Jia, Y. y Li, J., 2010. Enzymatic degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude manganese peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium*. En: *Journal of Hazardous Materials*, 177, pp.924-928.
- Zhao, X., Huang, X., Yao, J., Zhou, Y. y Jia, R., 2014. Fungal growth and manganese peroxidase production in a deep tray solid-state bioreactor, and in vitro decolorization of poly R-478 by MnP. En: *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, pp.803-813.
- Zheng, Z. y Obbard, J. P., 2002. Removal of surfactant solubilized polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium* in a rotating biological contactor reactor. En: *Journal of Biotechnology*, 96, pp.241-249.

# Implementación de métodos moleculares y microscópicos para estudios clínicos y ambientales relativos a *Cryptosporidium* sp. en Uruguay

## Implementation of Molecular and Microscopy Methods for Clinical and Environmental Studies on *Cryptosporidium* sp. in Uruguay

Rey, Fabiana (1), Acosta, Silvina (2), Martínez, Wilner (2), Lena, Anaydé (3), Tort, Cecilia (3), Acuña, Ana (3), Míguez, Diana (1), Ureta, Alejandro (4)

(1) Gerencia I+D+i, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU / Fundación LATITUD.

(2) Servicio de BIODOSIMETRÍA. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, IIBCE. Ministerio de Educación y Cultura.

(3) Departamento de Parasitología y Micología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, UdelaR.

(4) Gerencia de Agua Potable, Obras Sanitarias del Estado, OSE.

Contacto: correo.aureta@gmail.com

RECIBIDO: 15/8/2016 – APROBADO: 25/11/2016

### Resumen

El género *Cryptosporidium* se compone de protozoarios parásitos que infectan las células epiteliales del tracto gastrointestinal de una amplia variedad de vertebrados. Esta parasitosis puede ser adquirida por diferentes vías que incluyen el contacto directo con personas o animales infectados y la ingestión de alimentos o aguas contaminadas con el estadio ambiental de este microorganismo, el ooquiste. La significación sanitaria y ambiental de este parásito hace necesario para Uruguay implementar herramientas específicas, rápidas y robustas que permitan un estudio adecuado de su incidencia clínica y distribución ambiental (temporal y geográfica). En este trabajo se describe la implementación de métodos moleculares y de microscopía que contribuirán en su conjunto al conocimiento de la incidencia sanitaria y distribución ambiental de este protozoario, así como a mitigar el riesgo que *Cryptosporidium* sp. potencialmente representa en nuestro país.

**Palabras clave:** *Cryptosporidium*, ambiente, aguas, epidemiología.

### Summary

The *Cryptosporidium* genus is composed of protozoan parasites that infect the epithelial cells of the gastrointestinal tract of a wide range of vertebrates. This parasitosis can be transmitted through routes that include the direct contact with infected animals or persons as well as through the ingestion of food or water containing the environmental stage of this microorganism, the oocysts. The sanitary and environmental significance of this parasite makes necessary for Uruguay to implement specific, fast and robust tools enabling a proper study of their clinical impact as well as its environmental distribution (temporal and geographical). This paper describes the implementation of molecular and microscopy methods that will contribute to the understanding of the clinical incidence and environmental distribution of these protozoa as well as to the mitigation of the risk that *Cryptosporidium* potentially represents in our country.

**Keywords:** *Cryptosporidium*, environment, water, epidemiology.

## Introducción

El género *Cryptosporidium* se compone de protozoarios parásitos que infectan las células epiteliales del tracto gastrointestinal de una amplia variedad de vertebrados (Tyzzer, 1910; Slavin, 1955; Current y Garcia, 1991; O'Donoghue, 1995; de

Graaf, et al., 1999; O'Handley y Olson, 2006). A pesar de las similitudes con otros grupos de coccidios, *Cryptosporidium* demuestra varias particularidades, como su localización y colonización de la superficie apical de las células hospederas,

constituyéndose en parásitos intracelulares pero extracitoplásmicos (Levine, 1984; Tzipori y Widmer, 2000; Petry, 2004). Esta parasitosis puede ser adquirida por diferentes vías que incluyen el contacto directo con personas o animales infectados y la ingestión de alimentos o aguas contaminadas con el estadio ambiental de este microorganismo, sus ooquistes (Bouzid, et al., 2013).

*Cryptosporidium* es un microorganismo significativo en la industria del agua debido fundamentalmente al gran número de ooquistes liberados al ambiente por animales parasitados, a la baja dosis infectiva que evidencian, a su persistencia en aguas ambientales y a la resistencia que muestran a las concentraciones de desinfectante y tiempos de contacto correspondientes normalmente empleados en el proceso de producción de agua potable (Miller, et al., 1990; DuPont, et al., 1995; Chappell, et al., 1996; Ives, et al., 2007; Castro-Hermida, et al., 2008; Shields, et al., 2008; Mons, et al., 2009; Chalmers, 2012; Bouzid, et al., 2013).

Actualmente se reconocen alrededor de 25 especies de *Cryptosporidium sp.* capaces de parasitar peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Chalmers, 2012). La comprensión de las dinámicas de transmisión y el riesgo sanitario representado por ellas ha sido lento y complejo, en gran medida debido a que las especies de este protozoario son indistinguibles entre sí por los métodos de microscopía óptica. Hoy, gracias al aporte de los métodos moleculares, es posible llevar adelante estudios profundos en relación a la epidemiología y origen ambiental de estos protozoarios (Plutzer y Karanis, 2009; Fayer, et al., 2010; Xiao, 2010; Ng, et al., 2011; Chalmers, 2012). En este sentido, herramientas basadas en el PCR han permitido, por medio de la detección e identificación de especies, familias y subtipos moleculares, evaluar el riesgo sanitario que ellas representan. Es así por ejemplo que pudo determinarse que *Cryptosporidium hominis*, seguido por *Cryptosporidium parvum* son las especies más comúnmente asociadas a la criptosporidiosis en humanos. Conjuntamente con las metodologías para identificar especies se han venido evaluando e implementando herramientas para el estudio y análisis de las relaciones intra-específicas que han permitido definir y asignar dentro de las especies de este protozoario, diversas familias y subtipos moleculares (Strong, et al., 2000; Sulaiman, et al., 2005; Cama, et al., 2007; Tanriverdi, et al., 2007; Plutzer y Karanis, 2009; Dyachenko, et al., 2010; Fayer, et al., 2010; Xiao, 2010; Ng, et al., 2011; Chalmers, 2012). Estas herramientas, basadas en la amplificación por PCR y análisis de las secuencias nucleotídicas polimórficas, como por ejemplo la región ITS-2, minisatélites y microsátélites tradicionales o la región 3' del gen *gp60* de este microorganismo, han sido y continúan siendo empleadas para el estudio de la transmisión de *Cryptosporidium hominis* en humanos y *Cryptosporidium parvum* en animales y humanos, así como para la evaluación del origen de eventos de contaminación ambiental por estos protozoarios (Strong, et al., 2000; Sulaiman, et al., 2005; Cohen, et al., 2006; Cama, et al., 2007; Tanriverdi, et al., 2007; Geurden, et al., 2009; Plutzer y Karanis, 2009; Xiao, et al., 2009; Dyachenko, et al., 2010; Fayer, et al., 2010; Xiao, 2010; Chalmers, et al., 2011; Ng, et al., 2011; Waldron, et al., 2011; Chalmers, 2012; Koehler, et al., 2013).

De las mencionadas anteriormente, la herramienta molecular de mayor uso en la identificación de familias y subtipos en especies de *Cryptosporidium sp.* es la secuencia del gen *gp60*, que codifica una glicoproteína de 60 KDa localizada en la superficie apical de las formas invasivas de este protozoario

y que en humanos es el blanco principal de la respuesta inmune humoral durante procesos infectivos (Gatei, et al., 2006; Leoni, et al., 2007; Leoni, et al., 2007; Wielinga, et al., 2008; Johnson, et al., 2013). Aun cuando se han descrito otros marcadores capaces de discriminar subtipos de este parásito, el nivel de polimorfismo de *gp60* (dado fundamentalmente por el número de tripletes o codones repetidos para el aminoácido Serina) y el rol biológico de la glicoproteína correspondiente permite relacionar las características de este protozoario a su rango de hospederos y a las manifestaciones clínicas asociadas a cada familia y subtipo molecular (O'Connor, et al., 2007).

Esta herramienta de tipificación ha permitido realizar evaluaciones epidemiológicas de esta parasitosis así como el estudio del origen y seguimiento de brotes de criptosporidiosis asociados a alimentos y aguas (Peng, et al., 2001, Harper, et al., 2002; Harrison, et al., 2002; Sopwith, et al., 2005; Cama, et al., 2007; Chalmers, 2008; Hunter, et al., 2008; Wielinga, et al., 2008; Ethelberg, et al., 2009; Feng, et al., 2009; Ng, et al., 2010; Robinson y Chalmers, 2010; Smith y Nichols, 2010; Widmer y Lee, 2010; Gormley, et al., 2011; Ruecker, et al., 2012; Caccio, et al., 2013). Hasta hoy, el brote de criptosporidiosis ocurrido en el año 1993 en la ciudad de Milwaukee, EE.UU., con un estimado de 400.000 personas afectadas y aproximadamente 150 muertos, es el caso más importante y difundido (Mac Kenzie, et al., 1994). No obstante ello, brotes de esta parasitosis asociados a aguas ambientales y potables continúan ocurriendo (Baldursson y Karanis, 2011; Hlavsa, et al., 2011; Chalmers, 2012).

En función de la significación que la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium sp.* en aguas tiene desde el punto de vista sanitario y ambiental es necesario para nuestro país contar con herramientas que permitan evaluar de forma específica y rápida la presencia y concentración de ooquistes de *Cryptosporidium sp.* en aguas ambientales, identificando al mismo tiempo las especies dominantes presentes, la integridad de sus ooquistes e integrando herramientas de tipificación que permitan conocer el origen animal o humano de contaminación por este parásito, la incidencia clínica de especies y subtipos, su significación epidemiológica así como su distribución ambiental.

En este trabajo, y considerando la potencial vinculación entre los aspectos clínicos y ambientales de esta parasitosis, se describe la implementación de métodos moleculares y microscópicos para el análisis de muestras clínicas y aguas que permitirán en su conjunto conocer la distribución ambiental e incidencia clínica de este parásito en Uruguay así como eventualmente mitigar el riesgo sanitario y ambiental asociado a este protozoario.

## Materiales y Métodos

### Ooquistes de *Cryptosporidium parvum*

Ooquistes infectivos de *Cryptosporidium parvum* de origen bovino correspondientes al aislamiento Iowa y obtenidos a partir de la parasitosis experimental de terneros fueron comercialmente adquiridos de la compañía Waterborne Inc. (New Orleans, USA) y preservados de acuerdo a las indicaciones del proveedor. La concentración de la solución de ooquistes fue verificada por conteo en cámara de Neubauer. A partir de estas determinaciones se prepararon soluciones

de  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$  y  $5 \times 10^1$  ooquistes para extracción de ADN para evaluar el límite de detección de los ensayos de PCR de tiempo final y el comportamiento del kit de PCR de tiempo real empleado en este trabajo.

## Diagnóstico parasitológico de criptosporidiosis

El diagnóstico de criptosporidiosis intestinal fue confirmado mediante el Examen Coproparasitario (realizado a través de determinaciones coproparasitarias) con técnicas de enriquecimiento según el método de Ritchie. Brevemente, las muestras de materia fecal fueron homogeneizadas en una solución 0,85% de NaCl, filtradas y centrifugadas a 900 X g durante 1 minuto. El material sedimentado fue resuspendido y fijado con formol, extrayendo las grasas por medio de la adición de éter sulfúrico o acetato de etilo. Las muestras fueron nuevamente centrifugadas durante 2 minutos y parte del material sedimentado fue transferido a láminas portaobjetos para su evaluación microscópica, previa tinción según el método Kinyoun o Ziehl-Neelsen modificado (Manser, et al., 2014).

## Extracción de ADN a partir de ooquistes comerciales y materia fecal humana correspondiente a casos clínicos de criptosporidiosis

Se extrajo ADN a partir de  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$  y  $5 \times 10^1$  ooquistes de *Cryptosporidium parvum* resuspendidos en 0,5 mL de buffer 100 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA. Para ello, los ooquistes fueron sometidos a ciclos de congelado – descongelado en baño de hielo seco-alcohol y estufa a 70 °C, respectivamente. Completadas estas etapas se agregó 1 volumen de buffer de lisis (100 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 M NaCl, 1 % CTAB precalentado a 70 °C) incubando las muestras a 70 °C durante 45 minutos. Transcurrido ese período se agregó Proteinasa K a una concentración final de 100 µg/mL incubando las muestras a 70 °C durante otros 45 minutos. A partir de ahí y para la purificación de ADN las muestras fueron procesadas con el QiAmp DNA Mini Kit (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante y eluyendo el ADN en un volumen final de 50 µL.

Para la extracción de ADN a partir de materia fecal humana, 0,5 g de muestras no fijadas fueron homogeneizadas en buffer 100 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA. Una vez completada la homogenización, y para la extracción y purificación del ADN las muestras fueron tratadas según lo indicado anteriormente, con la excepción de que para la primera incubación de 45 minutos a 70 °C se adicionó al buffer de lisis, lisozima a una concentración final de 100 µg/mL.

## Detección de *Cryptosporidium sp.* por PCR de tiempo final y evaluación de especie por PCR-RFLP

Las reacciones de PCR de tiempo final fueron llevadas adelante en equipos Palm Cycler (Corbett) modelo CG1-96. Las mezclas de PCR contuvieron 1 µL de las soluciones correspondientes de ADN blanco, 50 µM de cada deoxynucleósido trifosfato, 50 µg/mL de Albúmina Sérica Bovina, 1% de Dimetilsulfóxido (DMSO), 2 mM de mgCl<sub>2</sub>, 20 pmoles de

primers directo y reverso y 1.5 Unidades de ADN polimerasa Taq en un volumen final de 25 µL en una solución 1X del buffer correspondiente. Para estas reacciones se utilizó un sistema de PCR anidado empleando los primers BcowpF (5'-ACC GCT TCT CAA CAA CCA TCT TGT CCT C-3') y BcowpR (5'-CGC ACC TGT TCC CAC TCA ATG TAA ACC C-3') para los primeros rounds y los primers Cry-15 (5'-GTA GAT AAT GGA AGA GAT TGT G-3'), y Cry-9 (5'-GGA CTG AAA TAC AGG CAT TAT CTT G-3') para los segundos rounds, los cuales permiten la amplificación de un fragmento del gen de copia única *cowPI* (Xiao, et al., 2000). En este punto es importante destacar que dado que cada ooquiste de *Cryptosporidium sp.* contiene en su interior 4 esporozoítos haploides, cada ooquiste posee 4 copias del gen *cowPI* (Bouzi, et al., 2013).

El perfil térmico de los primeros y segundos rounds consistió en una incubación inicial a 95 °C durante 5 minutos, 35 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto, seguidos por una extensión final a 72 °C durante 10 minutos con el posterior mantenimiento de las reacciones a 4 °C.

Para la determinación de especies de *Cryptosporidium* dominantes, los productos de PCR fueron digeridos a 37 °C con 10 Unidades de la enzima de restricción *RsaI*. Los productos de PCR y PCR-RFLP fueron resueltos por electroforesis en agarosa al 2% y teñidos con el compuesto Gel-Red. Los marcadores de peso molecular empleados fueron los marcadores M0623 o M1331 (Fermentas), de acuerdo a lo indicado en las Figuras 1, 2, 3 y 5.

## Amplificación del gen *gp60*, secuenciación y evaluación de familias y subtipos de *Cryptosporidium hominis*

Para la determinación de las familias y subtipos clínicos de *Cryptosporidium hominis* identificados en este trabajo se empleó un sistema de PCR anidado para la amplificación y análisis de la secuencia nucleotídica de un fragmento del gen *gp60* de este protozoario. Las mezclas de PCR contuvieron 1 µL de las soluciones correspondientes de ADN blanco, 50 µM de cada deoxynucleósido trifosfato, 1 µg de Albúmina Sérica Bovina, 1% de Dimetilsulfóxido (DMSO), 1 mM de mgCl<sub>2</sub>, 20 pmoles de primers directo y reverso y 1.5 Unidades de ADN polimerasa Taq en un volumen final de 25 µL en una solución 1X del buffer correspondiente. Los primers AL3531 (5'-ATAGTCTCCGCTGTATTC-3') y AL3535 (5'-GAGATA-TATCTTGGTGCG-3') fueron empleados para los primeros rounds de estas amplificaciones, mientras que los primers AL3532 (5'-TCCGCTGTATTCTCAGCC-3') y AL3534 (5'-GAACCACATTACAAATGAAG-3') fueron empleados para los segundos rounds de PCR (Alves, et al., 2003). El perfil térmico tanto de los primeros y segundos rounds consistió en una incubación inicial a 95 °C durante 5 minutos, 35 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto, seguidos por una extensión final a 72 °C durante 10 minutos con el posterior mantenimiento de las reacciones a 4 °C. Los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis en agarosa al 2% y teñidos con el compuesto Gel-Red.

Los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados en ambas direcciones por el método de Sanger por la compañía Macrogen, Inc. (Korea). Las secuencias de ADN obtenidas fueron almacenadas y analizadas en el software MEGA 7

(v 7.0.18) tomando como referencia las secuencias Genbank AF164502 (familia Ia), AY262031 (familia Ib), DQ665692 (familia Id), AY738184 (familia Ie), AF440638 (familia If), EF208067 (familia Ig), FJ971716 (familia Ih), HM234173 (familia Ii) y JF681174 (familia Ij). La pertenencia a las familias y subtipos fueron respectivamente evaluadas a través del alineamiento empleando el algoritmo Clustal W del análisis de la relación filogenética realizada, según el método Neighbor-Joining (NJ), y por la evaluación del tipo y número de microsatélites presentes en las mismas, según lo establecido al respecto (Alves, et al., 2003; Sulaiman, et al., 2005).

### Evaluación de la presencia de *Cryptosporidium* sp. en aguas ambientales

Muestras de 100 mL de agua correspondiente a un curso superficial fueron refrigeradas y transportadas al laboratorio para su inmediato procesamiento. Las muestras fueron filtradas en membranas compuestas de ésteres de celulosa con una porosidad de 1,2  $\mu\text{m}$  y de un diámetro de 47 mm (Millipore). Completada la etapa de filtración, las membranas fueron transferidas a tubos tipo Falcon de 50 mL conteniendo 2 mL de buffer de lisis precalentado a 70 °C, resuspendiendo el material retenido por vortex y pipeteo. El ADN correspondiente fue extraído y purificado de acuerdo a lo indicado anteriormente.

### Cuantificación de *Cryptosporidium* sp. por PCR de tiempo real

Las reacciones de PCR de tiempo real fueron llevadas adelante en un equipo Rotorgene™ modelo R6 6000 (Corbett). Para estos ensayos se emplearon los kits Genesig® *Cryptosporidium* Oocyst Wall Protein (COWP) gene Kit (PrimerDesign Ltd) y Oasig™ qPCR Mastermix (PrimerDesign Ltd). Al igual que el sistema de PCR de tiempo final implementado, este sistema de PCR basa la cuantificación en la amplificación de un fragmento del gen *cowP1* de este protozoario. Se verificó el comportamiento de estos kits a partir de ensayos de cuantificación del material standard incluido (copias génicas de *cowP1*) y la respuesta de amplificación a 250 ooquistes (1000 copias génicas) de acuerdo a lo evaluado en los conteos en cámara de Neubauer. Las mezclas de reacción (conteniendo 1  $\mu\text{L}$  de cada solución de ADN) y perfiles térmicos fueron los indicados por el fabricante.

### Siembra de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en agua distribuida, recuperación y extracción de ADN

Se emplearon 3 diluciones seriadas al medio ooquistes comerciales de *Cryptosporidium parvum* para la adición a 20 L de agua de distribución a ser filtrada por vacío en membranas compuestas de ésteres de celulosa con una porosidad de 1,2  $\mu\text{m}$  y de un diámetro de 47 mm (Millipore). Completada la filtración, las membranas fueron transferidas a tubos tipo Falcon de 50 mL con 2 mL de buffer de lisis y resuspendiendo los ooquistes por vortex y pipeteo. Una vez eluidos, el ADN correspondiente fue extraído y purificado de acuerdo a lo

indicado anteriormente para llevar adelante reacciones de PCR de tiempo real.

### Identificación y recuento de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* mediante ensayos de inmunomarcación y microscopía de fluorescencia

Para la identificación y recuento de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* fue empleado el kit A400FLK Crypt-a-Glo™ Comprehensive Kit de la compañía Waterborne Inc. (New Orleans, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Entre otros, este sistema está compuesto por un anticuerpo monoclonal (desarrollado en ratón) contra epítopes exteriores de los ooquistes de *Cryptosporidium* sp. conjugado al fluorocromo Fluorescein-isothiocianato (FITC) y por el compuesto Evan's Blue (EB).

Para la fijación de los ooquistes sobre portaobjetos, se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra en Cytospin que se centrifugaron en un equipo Cellspin® I (Tharmac) a 2000 rpm durante 10 min. Para las evaluaciones por microscopía de inmunofluorescencia se emplearon los equipos Axioplan I con contraste de fase y Axioplan Mot II acoplado a un sistema de imágenes automatizado denominado ISIS (MetaSystems GmbH, Germany). Las muestras analizadas correspondieron a los ooquistes de la solución comercial adquirida así como también a ooquistes de *Cryptosporidium parvum* sembrados en agua ambiental, retenidos y recuperados a partir de la filtración en membrana de acuerdo a lo indicado anteriormente.

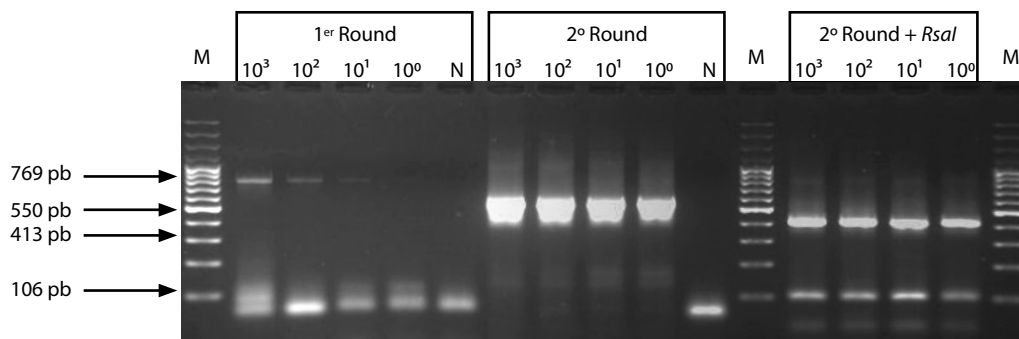
## Resultados

### Evaluación del sistema de PCR y PCR-RFLP para la detección y determinación de especie de *Cryptosporidium* sp.

Los resultados de la amplificación por PCR anidado del gen *cowP1* de *Cryptosporidium* sp. y la determinación de especie por PCR-RFLP se presentan en la **Figura 1**. Para estos ensayos se extrajo ADN a partir de  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^2$  y  $5 \times 10^1$  ooquistes comerciales de *Cryptosporidium parvum* realizando reacciones de PCR a partir de volúmenes de muestras de ADN equivalentes a  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  y  $10^0$  ooquistes. Los resultados obtenidos muestran que si bien el primer round de PCR (producto de amplificación de 769 pb) evidencia un límite de detección equivalente a entre 100 y 10 ooquistes (correspondiente a 400 y 40 copias génicas, respectivamente), el segundo round correspondiente al PCR anidado (producto de amplificación de 550 pb) evidencia un límite de detección equivalente a alrededor de 1 ooquiste (correspondiente a 4 copias génicas). Estos ensayos fueron repetidos al menos 5 veces, evidenciando en lo que respecta a este parámetro una mayor sensibilidad a lo reportado por Yu y colaboradores (Yu, et al., 2009) para este sistema de PCR.

La incorporación de etapas de congelado – descongelado para la extracción de ADN hecha en este trabajo explica la mayor sensibilidad alcanzada.

La repetitividad de los perfiles de restricción obtenidos con la enzima *RsaI* a partir de los segundos rounds de amplificación (primers Cry-15 y Cry-9), de acuerdo a lo indicado en la **Figura 1**, generados a partir de distintas cantidades iniciales de copias génicas, evidencia el buen funcionamiento de las condiciones de restricción para la identificación de especies



**Figura 1.** Evaluación del comportamiento del sistema de PCR y PCR-RFLP en la detección y determinación de especie de *Cryptosporidium sp.* Se indican los límites de detección del primer (1<sup>er</sup> Round) y segundo round (2<sup>o</sup> Round) del sistema de amplificación del gen *cowP1* de este protozoo así como el perfil de restricción obtenido con la enzima *RsaI* a partir de la restricción del producto amplificado en el segundo round de PCR del fragmento correspondiente a *Cryptosporidium parvum* comercial. 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>1</sup>, 10<sup>0</sup> indica el equivalente en ooquistes al ADN presente en cada reacción. N: Control Negativo. M: Marcador de peso molecular M0623 (Fermentas). Las flechas indican el tamaño de los amplicones y productos de restricción correspondiente. La figura representa una de 10 réplicas en lo que respecta a los límites de detección del sistema implementado.

Matrices	Positivos previo a la siembra de ooquistes	Falsos negativos	Límite de detección (equivalente a ooquistes)	Repetitividad	RFLP
Agua MilliQ *	0 (5)	0 (5)	1	5 (5)	Si
Agua potable distribuida *	0 (5)	0 (5)	1	5 (5)	Si
Agua superficial *	0 (5)	0 (5)	1	5 (5)	Si
Afluente residual doméstico *	0 (5)	0 (5)	1	5 (5)	Si
Materia fecal humana &		0 (5)			Si
Materia fecal bovina *	0 (5)	0 (5)	1	5 (5)	Si

\* Ooquistes comerciales sembrados  
& casos clínicos de criptosporidiosis

**Tabla 1.** Performance de los sistemas de PCR de tiempo final anidado y PCR-RFLP para la detección del gen *cowP1* de *Cryptosporidium sp.* Previo a las siembras de ooquistes en las matrices analizadas las reacciones de PCR anidado no detectaron la presencia del protozoo. Una vez sembradas no se observaron falsos negativos.

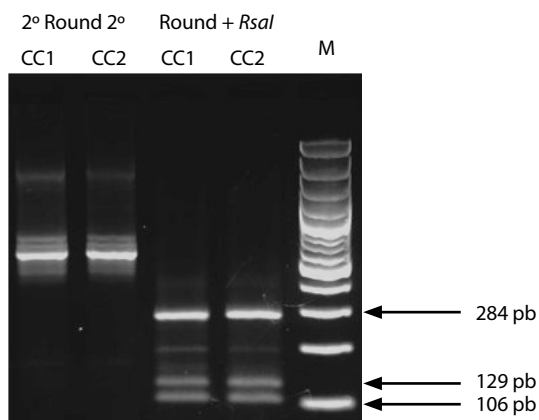
de *Cryptosporidium sp.* empleadas en este trabajo de acuerdo al sistema de PCR-RFLP inicialmente descrito por Xiao y colaboradores (Xiao, et al., 2000). La performance del sistema de PCR de tiempo final y PCR-RFLP implementado se resumen en la **Tabla 1**.

Su especificidad y robustez fue también evaluada a partir del análisis de casos clínicos de criptosporidiosis en humanos. Tal como se evidencia en la **Figura 2**, el sistema de PCR implementado permitió confirmar en estos pacientes el diagnóstico clínico correspondiente y determinar la especie responsable de dichas parasitosis. En este sentido y de acuerdo a los perfiles de restricción obtenidos (productos de restricción para el segundo round de PCR de 284, 129 y 106 pb en cada caso), la especie presente en ambos pacientes corresponde a *Cryptosporidium hominis*. Análisis de metagenómica correspondientes a estas muestras clínicas (datos no presentados) mostraron además la especificidad del sistema de PCR implementado considerando que dichas reacciones tuvieron lugar en un background en los que el ADN de un amplio grupo de microorganismos evidencia amplificabilidad.

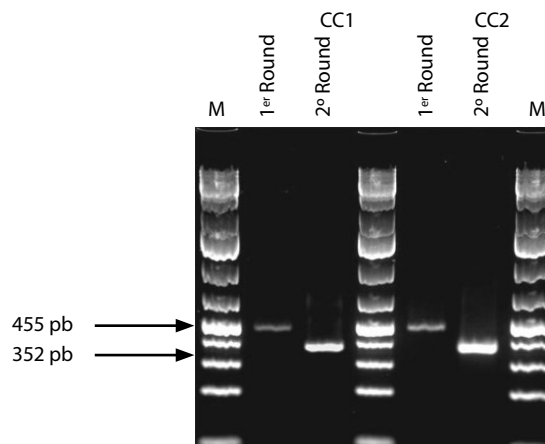
### Determinación de familia y subtipos de *Cryptosporidium sp.*

Con el objetivo de implementar herramientas que permitan evaluar la epidemiología de esta parasitosis y el origen de potenciales eventos de contaminación ambiental por este protozoo, se implementó un sistema de PCR que permite a través de la amplificación y análisis de la secuencia nucleotídica de un fragmento del gen *gp60* determinar la familia y el subtipo de dicho microorganismo (Alves, et al., 2003; Sulaiman, et al., 2005; Cama, et al., 2007). Estas determinaciones fueron realizadas a partir de los casos clínicos humanos evaluados y que corresponden a infecciones por *Cryptosporidium hominis*, de acuerdo a lo expresado anteriormente. En este sentido, mientras que la **Figura 3** evidencia el buen desempeño del sistema de PCR anidado implementado, la **Figura 4** refleja la familia taxonómica a la que el análisis de las secuencias de dichos amplicones permitió asignar (Familia Id). Estos análisis permitieron además asignar al subtipo IdA19T4 a las especies de *Cryptosporidium hominis* asociadas a dichas parasitosis. La significación de este hallazgo será evaluada en la medida que un mayor número de casos clínicos sean analizados.





**Figura 2.** Determinación por PCR-RFLP de la especie de *Cryptosporidium* (*Cryptosporidium hominis*) presente en la materia fecal de dos casos clínicos de criptosporidiosis. La figura muestra los resultados del segundo round (2° Round) de amplificación del gen *cowP1* empleando ADN total extraído de las muestras clínicas evaluadas así como los resultados de las restricciones correspondientes con la enzima *RsaI* (2° Round + *RsaI*). CC1: Caso Clínico 1, CC2: Caso Clínico 2. M: Marcador de peso molecular M1331 (Fermentas). Las flechas indican el tamaño de los productos de PCR y fragmentos de restricción correspondiente. La figura representa una de 3 réplicas en lo que respecta a las amplificaciones por PCR y restricciones correspondientes.



**Figura 3.** Amplificación por PCR de la región 3' correspondiente al gen *gp60* de *Cryptosporidium hominis* identificados en los casos clínicos analizados en este trabajo. La figura muestra los resultados correspondientes a los primeros (1er Round) y segundos rounds (2° Round) de amplificación de dicha región génica. CC1: Caso Clínico 1, CC2: Caso Clínico 2. M: Marcador de peso molecular M1331 (Fermentas). Las flechas indican el tamaño de los amplicones correspondientes. La figura representa una de 3 réplicas para ambos rounds de PCR.

### Evaluación de la presencia de *Cryptosporidium sp.* en aguas ambientales

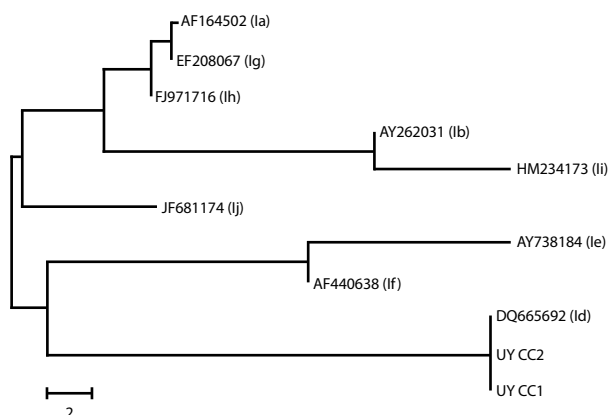
Como primer paso para evaluar con estas metodologías la potencial presencia y especie dominante de *Cryptosporidium sp.* en aguas ambientales del Uruguay, se realizaron ensayos de PCR de tiempo final y PCR-RFLP a partir del ADN total extraído de 100 mL de muestras extraídas de un curso de agua superficial próximo a una zona industrializada. Los resultados mostrados en la **Figura 5**, representativos de dos campañas de muestreo realizadas con 15 días de separación, permiten concluir la presencia de *Cryptosporidium parvum*. La evaluación de si estos resultados obedecieron a un único evento de contaminación, así como su origen (animal o humano) y las potenciales fuentes de contaminación deberán ser estudiados en detalle a través del seguimiento temporal y geográfico del cuerpo de agua correspondiente. Es importante notar que los muestreos indicados anteriormente fueron llevados a cabo durante un período de lluvias.

### Recuperación, cuantificación y evaluación de la integridad de ooquistes de *Cryptosporidium sp.*

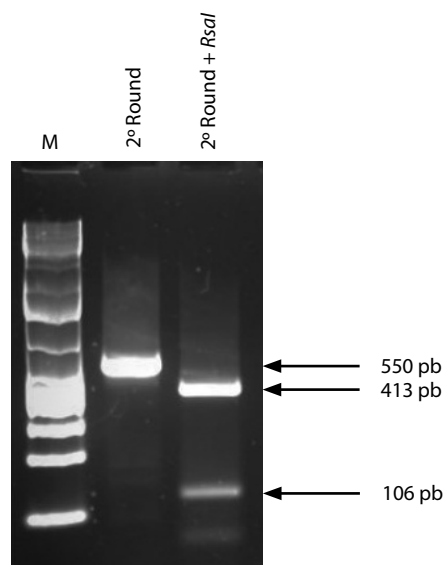
Para verificar el funcionamiento de los kits Genesig *Cryptosporidium* Oocyst Wall Protein (COWP) gene Kit (PrimerDesign Ltd) y Oasig qPCR Mastermix (Primer-

Design Ltd) empleados para las reacciones de PCR de tiempo real, se llevaron adelante amplificaciones partiendo de diferentes números de copias génicas del gen *cowP1* (material correspondiente al standard del kit empleado en este trabajo). La verificación de la performance del sistema de PCR de tiempo real empleado se resume en la **Tabla 2**. Asimismo, se incluyó en estos ensayos la evaluación del comportamiento de este sistema de PCR en la cuantificación de una cantidad inicial conocida de ooquistes (equivalente a 1000 copias génicas) comerciales de *Cryptosporidium parvum*. Un resultado representativo de estos análisis se presenta en la **Figura 6** y muestra la linealidad del sistema para el rango del número de copias evaluadas. Cabe destacar que el número de copias génicas estimado por el equipo fue de alrededor de 800, diferente de las 1000 copias génicas esperadas de acuerdo a lo agregado en las reacciones de PCR correspondientes. Esta diferencia es atribuible al error del método de conteo empleado (cámara de Neubauer) en la determinación del número de ooquistes inicialmente ensayados.

El procesamiento de muestras ambientales en las que evaluar la presencia de *Cryptosporidium sp.* requiere de una primera etapa de concentración de los ooquistes potencialmente presentes en ellas. La estrategia seguida en este trabajo para la recuperación o concentración de ooquistes fue de filtración en membranas (Xiao, et al., 2000; Xiao, et al., 2000; DiGiorgio, et al., 2002; Ferguson, et al., 2004; Lee, et al., 2004; Wohlsen, et al., 2004). Para evaluar la robustez de este método, diluciones seriadas al medio de ooquistes comerciales de este protozooario fueron sembrados en 20 L de agua distribuida. Luego de la filtración,



**Figura 4.** Relación taxonómica de familias del gen *gp60* de las especies de *Cryptosporidium hominis* identificados en los casos clínicos analizados en este trabajo y aislamientos de referencia. La proximidad taxonómica entre los casos clínicos analizados y el locus DQ665692 correspondiente a la familia Id del aislamiento 4308 de *Cryptosporidium hominis*, ubica a los casos clínicos analizados como pertenecientes a dicha familia. UY CC1: Caso Clínico 1, UY CC2: Caso Clínico 2.



**Figura 5.** Detección de *Cryptosporidium parvum* en agua ambiental. La figura muestra los resultados del segundo round (2° Round) de amplificación del gen *cowP1* empleando ADN total extraído a partir de 100 mL de muestra correspondiente a un curso de agua superficial de Uruguay, así como los resultados de la restricción correspondiente con la enzima *RsaI* (2° Round + *RsaI*). M: Marcador de peso molecular M1331 (Fermentas). Las flechas indican el tamaño de los amplicones y productos de restricción correspondiente. La figura representa una de 2 réplicas en lo que respecta a las amplificaciones por PCR y restricciones correspondientes.

Matrices	Verificación del límite de cuantificación (en copias génicas)	Verificación del rango dinámico (en copias génicas)	Eficiencia	Valor predictivo (R <sup>2</sup> )
Agua MilliQ *	100	100 - 10 <sup>6</sup>	0.99 - 1	0.99 - 1
Agua potable distribuída *	100	100 - 10 <sup>6</sup>	0.99 - 1	0.99 - 1

\* Copias Génicas Estándar Sembradas

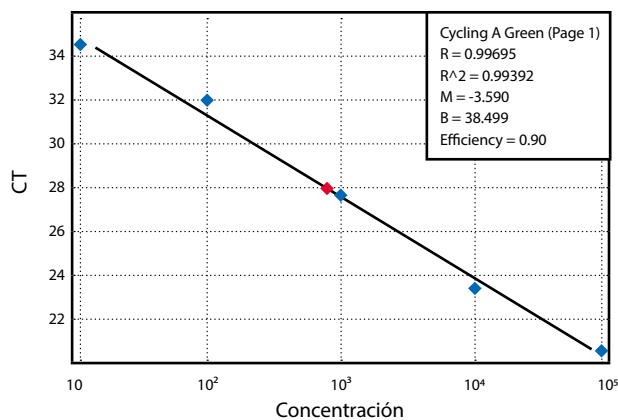
**Tabla 2.** Verificación de la performance del sistema de PCR de tiempo real empleado para la cuantificación del gen *cowP1* de *Cryptosporidium sp.* Previo a las siembras de las copias génicas estándar las reacciones de PCR de tiempo real no detectaron la presencia del protozoario.

el material retenido fue eluido y el ADN correspondiente extraído y sometido a reacciones de PCR de tiempo real. Los resultados obtenidos mostraron una tendencia lineal con un R<sup>2</sup> de 0,99 en la recuperación de ooquistes correspondientes a las diluciones seriadas evaluadas (Figura 7), lo que evidencia la robustez del método de recuperación. Para evaluar la significación sanitaria de la presencia ambiental de *Cryptosporidium sp.* no solo es fundamental determinar su concentración en las matrices analizadas y conocer la especie dominante presente sino también el grado de integridad de sus ooquistes. Para responder a esta interrogante en este trabajo se implementó un protocolo basado en microscopía de fluorescencia para la detección de ooquistes de este protozoario. El sistema implementado

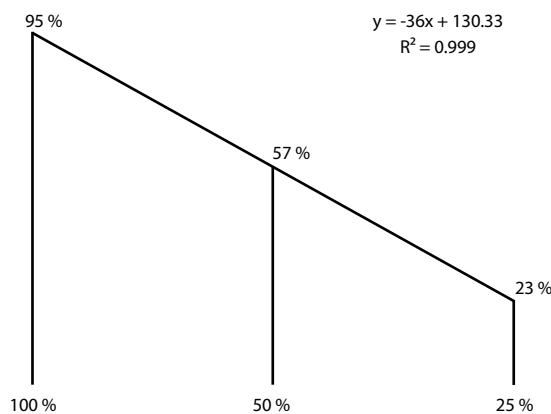
permite detectar de forma clara y específica ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, ya sea presentes en solución comercial (Figura 8) o sembrados en aguas superficiales y recuperados por filtración en membrana (Figura 9). Es interesante apreciar en la Figura 8 ooquistes con su envoltura comprometida doblemente teñidos por EB y FITC (UK Environment Agency, 2010).

## Discusión

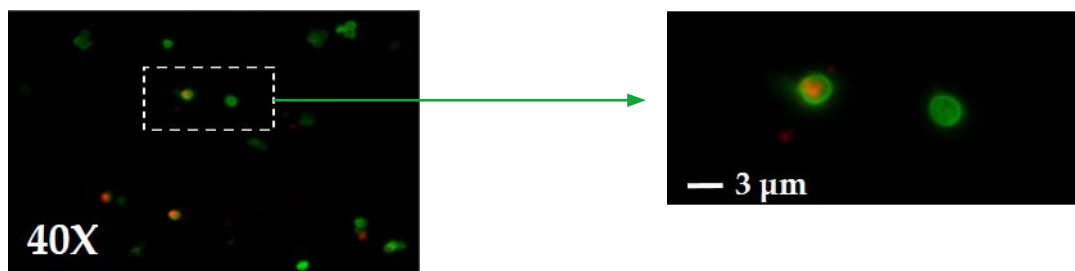
Las parasitosis por *Cryptosporidium sp.* se encuentran ampliamente distribuidas a nivel mundial, no obstante se presume que la prevalencia es mayor en países no desarrollados



**Figura 6.** Evaluación (verificación) del comportamiento del sistema de PCR de tiempo real empleado en este trabajo. En azul se indican los CT correspondientes a  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  y  $10^1$  copias genéticas del standard del kit Genesig *Cryptosporidium* Oocyst Wall Protein (COWP) gene Kit (PrimerDesign Ltd) y Oasig qPCR Mastermix (PrimerDesign Ltd). En rojo se indica el CT correspondiente a la amplificación de 800 copias genéticas iniciales de una preparación de ooquistes comerciales de *Cryptosporidium parvum*. El  $R^2$  de los resultados se indica en la parte superior derecha de la figura y es de 0.99392. La figura representa una de 3 réplicas en lo que respecta a las evaluaciones del sistema.



**Figura 7.** Evaluación por PCR de tiempo real de la robustez del sistema de recuperación de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* de origen comercial por filtrado, retención y elución de membranas filtrantes. La figura muestra la tendencia lineal de la recuperación relativa de tres diluciones de ooquistes seriadas al medio. De los porcentajes esperados inicialmente (indicados en la base del gráfico) se indican sobre la curva del gráfico los porcentajes de recuperación obtenidos. Dichos porcentajes corresponden al promedio de 3 ensayos de siembra. El  $R^2$  de la curva obtenida se indica en la parte media superior del gráfico y es de 0.999.

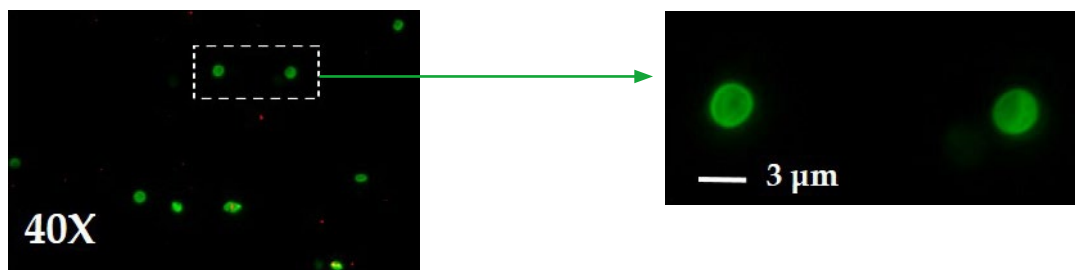


**Figura 8.** Inmunomarcación y detección por microscopía de fluorescencia de ooquistes comerciales de *Cryptosporidium parvum*. La imagen de la izquierda corresponde a una superposición de imágenes de los canales para los fluorocromos Evan's Blue (EB) y Fluorescein-isothiocianato (FITC) de uno de los campos fotografiados a 40 aumentos. La imagen de la derecha representa una magnificación digital de la zona delimitada por el rectángulo de líneas discontinuas en la imagen izquierda. En verde se aprecian los ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, que también evidencian tinción por Evan's Blue.

y afecta en humanos principalmente a la población infantil (Snelling, et al., 2007; Putignani y Menichella, 2010; Xiao, 2010). Entre los factores de riesgo asociados a estas parasitosis se encuentran los socioeconómicos y ambientales (por ejemplo, el acceso a un agua para consumo "segura" desde el punto de vista microbiológico), inmunocompetencia, estado de nutrición, edad, grado de contacto con animales y grado de hacinamiento o concentración de población (Robertson, et al., 2002; Goh, et al., 2004; Hunter, et al., 2004; Roy, et al., 2004; Lake, et al., 2007; Putignani y Menichella, 2010).

Es evidente la potencial contaminación de aguas ambientales, incluso aquellas empleadas como fuentes de agua potable, por parte de patógenos humanos y/o animales,

incluyendo *Cryptosporidium sp.* Esta contaminación puede asociarse al contacto directo de animales con cuerpos de agua, a la escorrentía de suelos contaminados y a potenciales fallas de los sistemas de tratamiento y/o disposición de aguas residuales, ya sean de origen humano o animal. La potencial diseminación ambiental de este protozooario, la intrínseca alta resistencia de sus ooquistes a las condiciones de desinfección normalmente empleadas durante el tratamiento de producción de agua potable, así como su capacidad para establecerse y sobrevivir en biofilms determinan que su presencia en aguas ambientales sea, al mismo tiempo, de especial significación para las empresas responsables de producir y distribuir este producto (Howe, et al., 2002; Angles,



**Figura 9.** Inmunomarcación y detección por microscopía de fluorescencia de ooquistes comerciales de *Cryptosporidium parvum* sembrados en agua superficial (ambiental), recuperados por filtración y elución de membranas filtrantes. La imagen de la izquierda corresponde a una superposición de imágenes de los canales para los fluorocromos Evan's Blue (EB) y Fluorescein-isothiocianato (FITC) de uno de los campos fotografiados a 40 aumentos. La imagen de la derecha representa una magnificación digital de la zona delimitada por el rectángulo de líneas discontinuas en la imagen izquierda. En verde se aprecian los ooquistes de *Cryptosporidium parvum*. Si bien en esta figura se observa algo de material teñido por el colorante EB, no se observan ooquistes doblemente teñidos por EB y FITC.

et al., 2007; Wolyniak, et al., 2009; Wingender y Flemming, 2011; DiCesare, et al., 2012; DiCesare, et al., 2012).

En nuestra región del continente, en particular en países como Argentina y Brasil, se viene evaluando la prevalencia y distribución ambiental de este microorganismo. En este sentido, en Argentina Saramago y colaboradores (Saramago, et al., 2016), al evaluar la materia fecal de 132 pacientes HIV positivos de la región de Buenos Aires observaron una prevalencia de las parasitosis por *Cryptosporidium sp.* del 11,4%. Entre los subtipos identificados por estos autores se encuentran el IbA10G2, IaA10G1R4, IaA11G1R4 y IaA11G3T3, en uno de los casos estudiados se identificó una co-infección por las familias Ia y Ila.

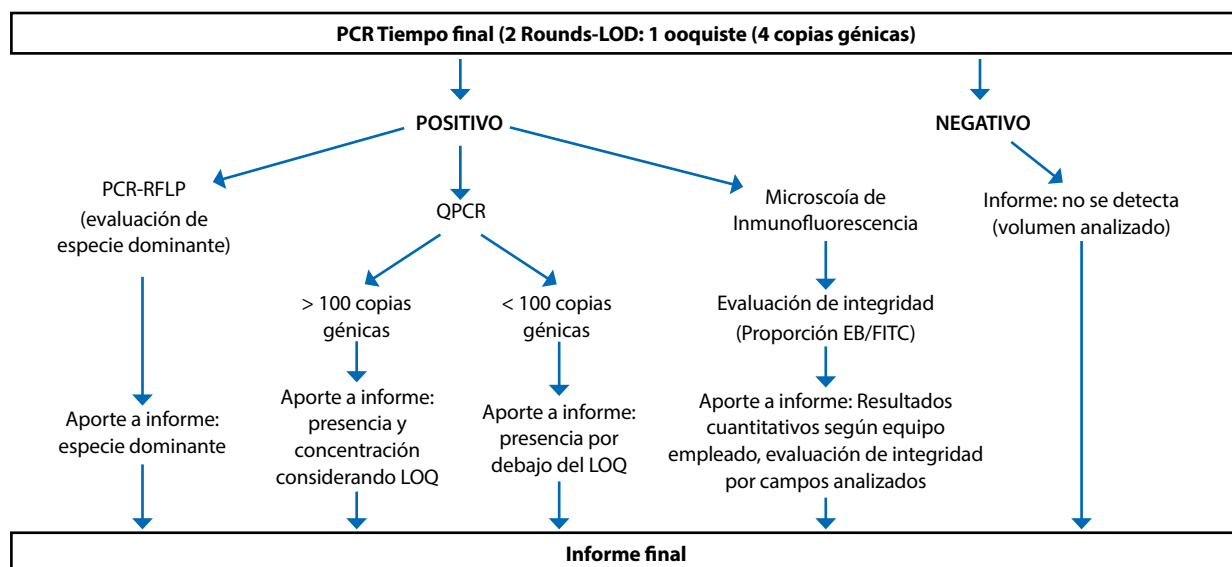
Respecto a la prevalencia veterinaria de este parásito, Tiranti y colaboradores (Tiranti, et al., 2011) analizaron la materia fecal de 620 terneros distribuidos en 43 tambos y lo encontraron presente en 19,35% de los casos, en su mayoría asociados a áreas de suelos con poco drenaje. Resultados similares fueron reportados por Del Coco y colaboradores (Del Coco, et al., 2008), quienes analizando la materia fecal de 280 terneros menores a 30 días de edad determinaron una prevalencia de *Cryptosporidium sp.* del 17%. Esta prevalencia trepó al 35% cuando se consideró a los terneros con diarrea. Más recientemente, Del Coco et al. (2014) evaluaron las familias/subtipos de 75 secuencias del gen *gp60* amplificadas a partir de la materia fecal de 73 terneros ubicados en tambos de la provincia de Buenos Aires y en los que se había detectado la presencia de *Cryptosporidium sp.*. Estos autores identificaron 7 subtipos del protozooario, todos pertenecientes a la familia Ila, y observaron al mismo tiempo una fuerte asociación entre estos y la distribución geográfica de los casos correspondientes. Estudios de este tipo fueron también publicados por Tomazic et al. (2013) a partir del análisis de la materia fecal de 45 terneros distribuidos en nueve granjas de la provincia de Buenos Aires, seis de la provincia de Santa Fe y tres de la provincia de Córdoba. Estos autores observaron la predominancia de los subtipos IlaA17G1R1 y IlaA21G1R1 en Buenos Aires, del subtipo IlaA23G1R1 en Santa Fe y de los subtipos IlaA20G1R1 y IlaA21G1R1 en Córdoba.

Al mismo tiempo, en Brasil, Saramago et al. (2016) evaluando la materia fecal de 89 pacientes HIV positivos de la región de Rio de Janeiro observaron una prevalencia de las parasitosis por *Cryptosporidium sp.* del 19,1%.

Respecto a la prevalencia veterinaria de este parásito, Araújo-Junior et al. (2013) analizaron la materia fecal de 100 terneros distribuidos en 10 tambos y encontraron este microorganismo presente en el 26% de los casos. Análisis de PCR-RFLP identificaron a las especies *Cryptosporidium andersonii*, *Cryptosporidium bovis* y *Cryptosporidium parvum*, en este último caso perteneciente al subtipo IlaA15G2R1, según el análisis de la secuencia de *gp60* correspondiente. Más recientemente, Carvalho et al. (2014) evaluaron la prevalencia y subtipos de *Cryptosporidium sp.* presentes en la materia fecal de 143 terneros distribuidos en tres tambos del estado de Rio de Janeiro. La prevalencia observada del protozooario fue del 16%, mientras que se identificaron ocho subtipos pertenecientes a la familia Ila, cuatro de los cuales fueron descritos por primera vez en la literatura. Respecto a la distribución ambiental de este protozooario, Araújo et al. (2011) encontraron la presencia de *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium meleagridis* y *Cryptosporidium sp.* en el 30% de muestras de aguas ambientales tomadas entre mayo de 2015 y diciembre de 2006 en cuerpos de agua ambiental de la zona del estado de San Pablo. Más recientemente, Campos Almeida et al. (2015) detectaron la presencia de *Cryptosporidium sp.* en el 8,33% de las muestras tomadas quincenalmente entre setiembre de 2012 y 2013 en fuentes de agua potable de la región de Londrina. Trabajos de este tipo en otras regiones del mundo muestran que la familia Ib predomina en Europa, América del Norte y Oceanía; el subtipo IbA10G2 es, por ejemplo, prevalente en el norte europeo. La familia Id, descrita en este trabajo, se ha reportado como la segunda de mayor prevalencia en Australia (Chalmers, et al., 2008; O'Brien, et al., 2008; Wiedling, et al., 2008; Xiao, 2010; Zhao, et al., 2016).

Las herramientas presentadas anteriormente e implementadas en este trabajo también tienen el potencial de ser empleadas en estudios para la identificación del origen de contaminación de aguas ambientales por este protozooario (Ruecker, et al., 2012; Wilkes, et al., 2013; Mahmoudi, et al., 2015; DeSilva, et al., 2016; Thivierge, et al., 2016).

En Uruguay la criptosporidiosis fue reportada por primera vez en 1987 por Zanetta et al. (1987). En 2001 *Cryptosporidium sp.* se identificó en el 7,5% de niños con diarreas persistentes admitidos en el Hospital Pereira Rossell de Montevideo (Torres, et al., 2001). En 2014 Gonzalez et al. (2014) reportaron que en pacientes con VIH/SIDA del



**Figura 10.** Diagrama de flujo propuesto para laboratorios clínicos o ambientales para determinación de la presencia, concentración, especie e integridad de ooquistes de *Cryptosporidium sp.* No se incluye en la figura pero queda a consideración de los laboratorios clínicos o ambientales la inclusión de sistemas para la determinación de familias y subtipos de *Cryptosporidium sp.* LOD: Limit of Detection, LOQ: Limit of Quantification, EB: Evan's Blue, FITC: Fluorescein-isothiocianato.

Servicio de Enfermedades Infecto-Contagiosas (SEIC) de la Administración de los Servicios de Salud del Estado (ASSE) de Uruguay, *Cryptosporidium sp.* se encontró presente como uno de los agentes causantes de diarrea identificados.

Uruguay cuenta hasta el momento con muy escasa información sobre la prevalencia clínica de esta parasitosis y carece de datos respecto a la distribución geográfica de *Cryptosporidium sp.*. Dada la significación sanitaria y ambiental de este microorganismo y para contribuir al estudio de estos aspectos se han implementado metodologías moleculares robustas y específicas aplicables por laboratorios clínicos o ambientales uruguayos para la detección, cuantificación, identificación de especies dominantes y evaluación del grado de integridad de ooquistes de *Cryptosporidium sp.* potencialmente presentes en muestras de aguas ambientales de Uruguay. En este sentido, las herramientas de PCR, PCR-RFLP, QPCR y microscopía de fluorescencia implementadas contribuirán a una mejor evaluación del riesgo representado por la presencia en aguas de este parásito. Asimismo, se han implementado herramientas basadas en el análisis de polimorfismos de la secuencia nucleotídica de la región 3' del gen *gp60* de *Cryptosporidium sp.* que permiten la determinación de familias y subtipos moleculares de este protozoario. Tal como se describió anteriormente dicha estrategia es ampliamente empleada en el estudio de la epidemiología de esta parasitosis así como en la determinación del origen, fuentes y potencial de dispersión ambiental de este protozoario (Feltus, et al., 2006; Trotz-Williams, et al., 2006; Jex, et al., 2007; Thompson, et al., 2007; Xiao, et al., 2007; Jex, et al., 2008; Santin, et al., 2008; Zintl, et al., 2009; Baldursson y Karanis, 2011; Hlavsa, et al., 2011; Chalmers, 2012). Durante el proceso de implementación de estas metodologías se ha identificado la presencia de *Cryptosporidium parvum* en aguas ambientales de Uruguay y de *Cryptosporidium hominis* en dos casos

clínicos humanos de criptosporidiosis, identificando la presencia en ambos del subtipo IdA19T4. La significación de este hallazgo y prevalencia de este subtipo debe ser estudiada en profundidad (Cama, et al., 2007; Chalmers, et al., 2008; Wielinga, et al., 2008; Feng, et al., 2009; Ng, et al., 2010; Xiao, 2010).

Dado que esta capacidad de identificar subtipos no es única para *gp60*, se espera implementar en el futuro estrategias basadas en el análisis de las secuencias de otros genes polimórficos y estrategias de Multi-Locus Sequence Typing (MLST) (Wielinga, et al., 2008; Feng, et al., 2014) que permitan complementar y profundizar estudios epidemiológicos de esta parasitosis en Uruguay. En conclusión, considerando el tipo de información aportada por cada una de las herramientas implementadas así como el desempeño de los sistemas de PCR, se propone para el control y seguimiento clínico y ambiental de este protozoario un algoritmo de trabajo que como primera etapa evalúe la presencia de *Cryptosporidium sp.* por el sistema implementado de PCR de tiempo final. En caso de registrarse resultados positivos, se deberían disparar ensayos paralelos de PCR-RFLP, PCR de tiempo real y de microscopía de fluorescencia (Figura 10). Estudios clínicos epidemiológicos o de determinación del origen de potenciales eventos de contaminación ambiental deberían apoyarse en la determinación de familias y subtipos moleculares dominantes de este protozoario.

## Reconocimientos

Los autores agradecen a la MSc. Lucía Boccardi, Dra. Ana Maquieira, MSc. Paula Mussio, Ing. Saúl Garat e Ing. Alejandro Iriburo el aporte y apoyo a este trabajo. El mismo se enmarca en el Convenio de Colaboración entre OSE y LATU aprobado por OSE según RD N° 1218/15.

## Referencias

- Alves, M., Xiao, L., Sulaiman, I., Lal, A. A., Matos, O. y Antunes, F., 2003. Subgenotype analysis of cryptosporidium isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. En: *J Clin Microbiol*, 41(6), pp.2744-2747.
- Angles, M. L., J. P. Chandy, P. T. Cox, I. H. Fisher y M. R. Warnecke, 2007. Implications of biofilm-associated waterborne Cryptosporidium oocysts for the water industry. En: *Trends Parasitol*, 23(8), pp.352-356.
- Araújo-Junior, F. M. P. y S. R. S. L. J. P., 2013. Identification of Cryptosporidium species and genotypes in dairy cattle in Brazil. En: *Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal*, 22(1), pp.22-28.
- Araujo, R. S., M. Dropa, L. N. Fernandes, T. T. Carvalho, M. I. Sato, R. M. Soares, G. R. Matte y M. H. Matte, 2011. Genotypic characterization of Cryptosporidium hominis from water samples in Sao Paulo, Brazil. En: *Am J Trop Med Hyg*, 85(5), pp.834-838.
- Baldursson, S. y Karanis, P., 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. En: *Water Res.*, 45(20), pp.6603-6614.
- Bouzid, M., Hunter, P. R., Chalmers, R. M. y Tyler, K. M., 2013. Cryptosporidium pathogenicity and virulence. En: *Clin Microbiol Rev*, 26(1), pp.115-134.
- Caccio, S. M., Sannella, A. R., Mariano, V., Valentini, S., Berti, F., Tosini, F. y Pozio, E., 2013. A rare Cryptosporidium parvum genotype associated with infection of lambs and zoonotic transmission in Italy. En: *Vet Parasitol*, 191(1-2), pp.128-131.
- Cama, V. A., Ross, J. M., Crawford, S., Kawai, V., Chavez-Valdez, R., Vargas, D., Vivar, A., Ticona, E., Navincopa, M., Williamson, J., Ortega, Y., Gilman, R.H., Bern, C. y Xiao, L., 2007. Differences in clinical manifestations among Cryptosporidium species and subtypes in HIV-infected persons. En: *J Infect Dis*, 196(5), pp.684-691.
- Campos Almeida, Jonatas; Cardoso Martins, Felipe Danyel; Ferreira Neto, José Maurício, Moreira dos Santos, Maíra, Garcia, João Luis y Teodorico Navarro, Italmar, Kiyomi Kuroda, Emília, Lemos Freire, Roberta, 2015. Occurrence of Cryptosporidium spp. and Giardia spp. in a public water-treatment system, Paraná, Southern Brazil. En: *Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal*, 24(3), pp.303-308.
- Castro-Hermida, J. A., Garcia-Preseido, I., Almeida, A., Gonzalez-Warleta, M., Correia Da Costa, J.M. y Mezo, M., 2008. Presence of Cryptosporidium spp. and Giardia duodenalis through drinking water. En: *Sci Total Environ*, 405(1-3), pp.45-53.
- Chalmers, R. M., 2008. Cryptosporidium: from laboratory diagnosis to surveillance and outbreaks. En: *Parasite*, 15(3), pp.372-378.
- Chalmers, R. M., 2012. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. En: *Ann Ist Super Sanita*, 48(4), pp.429-446.
- Chalmers, R. M., Hadfield, S. J., Jackson, C. J., Elwin, K., Xiao, L. y Hunter, P., 2008. Geographic linkage and variation in Cryptosporidium hominis. En: *Emerg Infect Dis*, 14(3), pp.496-498.
- Chalmers, R. M., R. Smith, K. Elwin, F. A. Clifton-Hadley y M. Giles, 2011. Epidemiology of anthroponotic and zoonotic human cryptosporidiosis in England and Wales, 2004-2006. En: *Epidemiol Infect*, 139(5), pp.700-712.
- Chalmers, R. M., A. L. Thomas, B. A. Butler y M. C. Morel, 2005. Identification of Cryptosporidium parvum genotype 2 in domestic horses. En: *Vet Rec*, 156(2), pp.49-50.
- Chappell, C. L., P. C. Okhuysen, C. R. Sterling y H. L. DuPont, 1996. Cryptosporidium parvum: intensity of infection and oocyst excretion patterns in healthy volunteers. En: *J Infect Dis*, 173(1), pp.232-236.
- Cohen, S., F. Dalle, A. Gallay, M. Di Palma, A. Bonnin y H. D. Ward, 2006. Identification of Cpgp40/15 Type Ib as the predominant allele in isolates of Cryptosporidium spp. from a waterborne outbreak of gastroenteritis in South Burgundy, France. En: *J Clin Microbiol*, 44(2), pp.589-591.
- Current, W. L. y L. S. Garcia, 1991. Cryptosporidiosis. En: *Clin Microbiol Rev*, 4(3), pp. 325-358.
- Del Coco, V. F., M. A. Cordoba y Basualdo, J. A., 2008. Cryptosporidium infection in calves from a rural area of Buenos Aires, Argentina. En: *Vet Parasitol*, 158(1-2), pp:31-35.
- Del Coco, V. F., M. A. Cordoba, G. Bilbao, A. P. de Almeida Castro, J. A. Basualdo, R. Fayer y Santin, M., 2014. Cryptosporidium parvum GP60 subtypes in dairy cattle from Buenos Aires, Argentina. En: *Res Vet Sci*, 96(2), pp.311-314.
- DeSilva, M. B., S. Schafer, M. Kendall Scott, B. Robinson, A. Hills, G. L. Buser, K. Salis, J. Gargano, J. Yoder, V. Hill, L. Xiao, D. Roellig y K. Hedberg, 2016. Communitywide cryptosporidiosis outbreak associated with a surface water-supplied municipal water system--Baker City, Oregon, 2013. En: *Epidemiol Infect*, 144(2), pp.274-284.
- DiCesare, E. A., B. R. Hargreaves y K. L. Jellison, 2012. Biofilm roughness determines Cryptosporidium parvum retention in environmental biofilms. En: *Appl Environ Microbiol*, 78(12), pp.4187-4193.
- DiCesare, E. A., B. R. Hargreaves and K. L. Jellison, 2012. Biofilms reduce solar disinfection of Cryptosporidium parvum oocysts. En: *Appl Environ Microbiol*, 78(12), pp.4522-4525.
- DiGiorgio, C. L., D. A. Gonzalez y C. C. Huitt, 2002. Cryptosporidium and Giardia recoveries in natural waters by using environmental protection agency method 1623. En: *Appl Environ Microbiol*, 68(12), pp.5952-5955.
- DuPont, H. L., C. L. Chappell, C. R. Sterling, P. C. Okhuysen, J. B. Rose y W. Jakubowski, 1995. The infectivity of Cryptosporidium parvum in healthy volunteers. En: *N Engl J Med*, 332(13), pp.855-859.
- Dyachenko, V., Y. Kuhnert, R. Schmaeschke, M. Etzold, N. Pantchev y A. Dausgchies, 2010. Occurrence and molecular characterization of Cryptosporidium spp. genotypes in European hedgehogs (Erinaceus europaeus L.) in Germany. En: *Parasitology*, 137(2), pp.205-216.
- Ethelberg, S., M. Lisby, L. S. Vestergaard, H. L. Enemark, K. E. Olsen, C. R. Stensvold, H. V. Nielsen, L. J. Porsbo, A. M. Plesner y K. Molbak, 2009. A foodborne outbreak of Cryptosporidium hominis infection. En: *Epidemiol Infect*, 137(3), pp.348-356.
- Fayer, R., 2010. Taxonomy and species delimitation in Cryptosporidium. En: *Exp Parasitol*, 124(1), pp.90-97.
- Feltus, D. C., C. W. Giddings, B. L. Schneck, T. Monson, D. Warshauer y J. M. McEvoy, 2006. Evidence supporting zoonotic transmission of Cryptosporidium spp. in Wisconsin. En: *J Clin Microbiol*, 44(12), pp.4303-4308.
- Feng, Y., N. Li, L. Duan y L. Xiao, 2009. Cryptosporidium genotype and subtype distribution in raw wastewater

- in Shanghai, China: evidence for possible unique *Cryptosporidium hominis* transmission. En: *J Clin Microbiol*, 47(1), pp.153-157.
- Feng, Y., N. Tiao, N. Li, M. Hlavsa y L. Xiao, 2014. Multilocus sequence typing of an emerging *Cryptosporidium hominis* subtype in the United States. En: *J Clin Microbiol*, 52(2), pp.524-530.
- Ferguson, C., C. Kaucner, M. Krogh, D. Deere y M. Warnecke, 2004. Comparison of methods for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from raw waters. En: *Can J Microbiol*, 50(9), pp.675-682.
- Gatei, W., C. A. Hart, R. H. Gilman, P. Das, V. Cama y L. Xiao, 2006. Development of a multilocus sequence typing tool for *Cryptosporidium hominis*. En: *J Eukaryot Microbiol*, 53 Suppl 1, pp.S43-48.
- Geurden, T., E. Goossens, B. Levecke, F. Vercammen, J. Vercruyse y E. Claerebout, 2009. Occurrence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in captive wild ruminants in Belgium. En: *J Zoo Wildl Med*, 40(1), pp.126-130.
- Goh, S., M. Reacher, D. P. Casemore, N. Q. Verlander, R. Chalmers, M. Knowles, J. Williams, K. Osborn y S. Richards, 2004. Sporadic cryptosporidiosis, North Cumbria, England, 1996-2000. En: *Emerg Infect Dis*, 10(6), pp.1007-1015.
- González, T.; Cabrera, F.; Rodríguez, T.; Combol, A.; Acuña, A., 2014. Enteroparasitosis en pacientes VIH/SIDA del Servicio de Enfermedades Infecciosas y Contagiosas (SEIC), ASSE. En: *Rev Urug Patol Clin*, 53(76).
- Gormley, F. J., C. L. Little, R. M. Chalmers, N. Rawal y G. K. Adak, 2011. Zoonotic cryptosporidiosis from petting farms, England and Wales, 1992-2009. En: *Emerg Infect Dis*, 17(1), pp.151-152.
- Harper, C. M., N. A. Cowell, B. C. Adams, A. J. Langley y T. D. Wohlsen, 2002. Outbreak of *Cryptosporidium* linked to drinking unpasteurized milk. En: *Commun Dis Intell Q Rep*, 26(3), pp.449-450.
- Harrison, S. L., R. Nelder, L. Hayek, I. F. Mackenzie, D. P. Casemore y D. Dance, 2002. Managing a large outbreak of cryptosporidiosis: how to investigate and when to decide to lift a 'boil water' notice. En: *Commun Dis Public Health*, 5(3), pp.230-239.
- Hlavsa, M. C., V. A. Roberts, A. R. Anderson, V. R. Hill, A. M. Kahler, M. Orr, L. E. Garrison, L. A. Hicks, A. Newton, E. D. Hilborn, T. J. Wade, M. J. Beach, J. S. Yoder y Cdc, 2011. Surveillance for waterborne disease outbreaks and other health events associated with recreational water --- United States, 2007--2008. En: *mMWR Surveill Summ*, 60(12), pp.1-32.
- Howe, A. D., S. Forster, S. Morton, R. Marshall, K. S. Osborn, P. Wright y P. R. Hunter, 2002. *Cryptosporidium* oocysts in a water supply associated with a cryptosporidiosis outbreak. En: *Emerg Infect Dis*, 8(6), pp.619-624.
- Hunter, P. R., S. Hughes, S. Woodhouse, N. Raj, Q. Syed, R. M. Chalmers, N. Q. Verlander y J. Goodacre, 2004. Health sequelae of human cryptosporidiosis in immunocompetent patients. En: *Clin Infect Dis*, 39(4), pp.504-510.
- Hunter, P. R., D. C. Wilkinson, I. R. Lake, F. C. Harrison, Q. Syed, S. J. Hadfield y R. M. Chalmers, 2008. Microsatellite typing of *Cryptosporidium parvum* in isolates from a waterborne outbreak. En: *J Clin Microbiol*, 46(11), pp.3866-3867.
- Ives, R. L., A. M. Kamarainen, D. E. John y J. B. Rose, 2007. Use of cell culture to assess *Cryptosporidium parvum* survival rates in natural groundwaters and surface waters. En: *Appl Environ Microbiol*, 73(18), pp.5968-5970.
- Jex, A. R., A. Pangasa, B. E. Campbell, M. Whipp, G. Hogg, M. I. Sinclair, M. Stevens y R. B. Gasser, 2008. Classification of *Cryptosporidium* species from patients with sporadic cryptosporidiosis by use of sequence-based multilocus analysis following mutation scanning. En: *J Clin Microbiol*, 46(7), pp.2252-2262.
- Jex, A. R., U. M. Ryan, J. Ng, B. E. Campbell, L. Xiao, M. Stevens y R. B. Gasser, 2007. Specific and genotypic identification of *Cryptosporidium* from a broad range of host species by nonisotopic SSCP analysis of nuclear ribosomal DNA. En: *Electrophoresis*, 28(16), pp.2818-2825.
- Johnson, C. R., S. K. Gorla, M. Kavitha, M. Zhang, X. Liu, B. Striepen, J. R. Mead, G. D. Cuny y L. Hedstrom, 2013. Phthalazinone inhibitors of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase from *Cryptosporidium parvum*. En: *Bioorg Med Chem Lett*, 23(4), pp. 1004-1007.
- Koehler, A. V., R. S. Bradbury, M. A. Stevens, S. R. Haydon, A. R. Jex y R. B. Gasser, 2013. Genetic characterization of selected parasites from people with histories of gastrointestinal disorders using a mutation scanning-coupled approach. En: *Electrophoresis*, 34(12), pp.1720-1728.
- Lake, I. R., F. C. Harrison, R. M. Chalmers, G. Bentham, G. Nichols, P. R. Hunter, R. S. Kovats y C. Grundy, 2007. Case-control study of environmental and social factors influencing cryptosporidiosis. En: *Eur J Epidemiol*, 22(11), pp.805-811.
- Lee, Y., L. L. Gomez, I. T. McAuliffe y V. C. Tsang, 2004. Evaluation of *Cryptosporidium parvum* oocyst recovery efficiencies from various filtration cartridges by electrochemiluminescence assays. En: *Lett Appl Microbiol*, 39(2), pp.156-162.
- Leoni, F., H. Gomez-Couso, M. E. Ares-Mazas y J. McLauchlin, 2007. Multilocus genetic analysis of *Cryptosporidium* in naturally contaminated bivalve molluscs. En: *J Appl Microbiol*, 103(6), pp.2430-2437.
- Leoni, F., M. E. Mallon, H. V. Smith, A. Tait y J. McLauchlin, 2007. Multilocus analysis of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* isolates from sporadic and outbreak-related human cases and *C. parvum* isolates from sporadic livestock cases in the United Kingdom. En: *J Clin Microbiol*, 45(10), pp.3286-3294.
- Levine, N. D., 1984. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (protozoa, apicomplexa). En: *J Protozool*, 31(1), pp.94-98.
- Mac Kenzie, W. R., N. J. Hoxie, M. E. Proctor, M. S. Gradus, K. A. Blair, D. E. Peterson, J. J. Kazmierczak, D. G. Addiss, K. R. Fox, J. B. Rose, et al., 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. En: *N Engl J Med*, 331(3), pp.161-167.
- Mahmoudi, M. R., E. Nazemalhosseini-Mojarad, B. Kazemi, A. Haghghi, A. Mirzaei, A. Mohammadiha, S. Jahantab, L. Xiao and P. Karanis, 2015. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes distribution in river water in Iran. En: *J Water Health*, 13(2), pp.600-606.
- Manser, M., M. Granlund, H. Edwards, A. Saez, E. Petersen, B. Evengard, P. Chiodini, M. European Society of Clinical y P. Infectious Diseases Study Group on Clinical, 2014.

- Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in clinical laboratories in Europe--a comparative study. En: *Clin Microbiol Infect*, 20(1), pp.O65-71.
- Carvalho Machado do Couto, Melissa, M. d. F. L. y T. C. B. d. Bomfim, 2014. New *Cryptosporidium parvum* subtypes of IIa subfamily in dairy calves from Brazil. En: *Acta Tropica*, (130), pp.117-122.
- Miller, R. A., M. A. Bronsdon y W. R. Morton, 1990. Experimental cryptosporidiosis in a primate model. En: *J Infect Dis*, 161(2), pp.312-315.
- Mons, C., A. Dumetre, S. Gosselin, C. Galliot y L. Moulin, 2009. Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* river contamination in Paris area. En: *Water Res*, 43(1), pp.211-217.
- Ng, J., B. MacKenzie y U. Ryan, 2010. Longitudinal multi-locus molecular characterisation of sporadic Australian human clinical cases of cryptosporidiosis from 2005 to 2008. En: *Exp Parasitol*, 125(4), pp.348-356.
- Ng, J., R. Yang, V. Whiffin, P. Cox y U. Ryan, 2011. Identification of zoonotic *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes infecting animals in Sydney's water catchments. En: *Exp Parasitol*, 128(2), pp.138-144.
- Ng, J. S., N. Pingault, R. Gibbs, A. Koehler y U. Ryan, 2010. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* outbreaks in Western and South Australia. En: *Exp Parasitol*, 125(4), pp.325-328.
- O'Brien, E., L. McInnes y U. Ryan, 2008. *Cryptosporidium* GP60 genotypes from humans and domesticated animals in Australia, North America and Europe. En: *Exp Parasitol*, 118(1), pp.118-121.
- O'Connor, R. M., J. W. Wanyiri, A. M. Cevallos, J. W. Priest y H. D. Ward, 2007. *Cryptosporidium parvum* glycoprotein gp40 localizes to the sporozoite surface by association with gp15. En: *Mol Biochem Parasitol*, 156(1), pp.80-83.
- O'Donoghue, P. J., 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. En: *Int J Parasitol*, 25(2), pp.139-195.
- O'Handley, R. M. y M. E. Olson, 2006. Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. En: *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 22(3), pp.623-643.
- Peng, M. M., O. Matos, W. Gatei, P. Das, M. Stantic-Pavlinic, C. Bern, I. M. Sulaiman, S. Glaberman, A. A. Lal y L. Xiao, 2001. A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. En: *J Eukaryot Microbiol*, Suppl, pp.28S-31S.
- Petry, F., 2004. Structural analysis of *Cryptosporidium parvum*. En: *Microsc Microanal*, 10(5), pp.586-601.
- Plutzer, J. y P. Karanis, 2009. Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. En: *Vet Parasitol*, 165(3-4), pp.187-199.
- Putignani, L. y D. Menichella, 2010. Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *cryptosporidium*. En: *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2010, pii.753512.
- Saramago Peralta, Regina Helena, J. N. V., Flavia de Souza Cunha, F. C. S. María Laura Pantano, Sidnei da Silva y J. M. P. Osvaldo Germán Astudillo, Silvana Carnevale, 2016. Genetic diversity of *Cryptosporidium* identified in clinical samples from cities in Brazil and Argentina. En: *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 111(1), pp.30-36.
- Robertson, B., M. I. Sinclair, A. B. Forbes, M. Veitch, M. Kirk, D. Cunliffe, J. Willis y C. K. Fairley, 2002. Case-control studies of sporadic cryptosporidiosis in Melbourne and Adelaide, Australia. En: *Epidemiol Infect*, 128(3), pp.419-431.
- Robinson, G. y R. M. Chalmers, 2010. The European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), a source of zoonotic cryptosporidiosis. En: *Zoonoses Public Health*, 57(7-8), pp.e1-13.
- Roy, S. L., S. M. DeLong, S. A. Stenzel, B. Shiferaw, J. M. Roberts, A. Khalakdina, R. Marcus, S. D. Segler, D. D. Shah, S. Thomas, D. J. Vugia, S. M. Zansky, V. Dietz y M. J. Beach, 2004. Risk factors for sporadic cryptosporidiosis among immunocompetent persons in the United States from 1999 to 2001. En: *J Clin Microbiol*, 42(7), pp.2944-2951.
- Ruecker, N. J., J. C. Matsune, G. Wilkes, D. R. Lapen, E. Topp, T. A. Edge, C. W. Sensen, L. Xiao y N. F. Neumann, 2012. Molecular and phylogenetic approaches for assessing sources of *Cryptosporidium* contamination in water. En: *Water Res*, 46(16), pp.5135-5150.
- Santin, M., J. M. Trout y R. Fayer, 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. En: *Vet Parasitol*, 155(1-2), pp.15-23.
- Shields, J. M., V. R. Hill, M. J. Arrowood y M. J. Beach, 2008. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* under chlorinated recreational water conditions. En: *J Water Health*, 6(4), pp.513-520.
- Slavin, D., 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). En: *J Comp Pathol*, 65(3), pp. 262-266.
- Smith, H. V. y R. A. Nichols, 2010. *Cryptosporidium*: detection in water and food. En: *Exp Parasitol*, 124(1), pp.61-79.
- Snelling, W. J., L. Xiao, G. Ortega-Pierres, C. J. Lowery, J. E. Moore, J. R. Rao, S. Smyth, B. C. Millar, P. J. Rooney, M. Matsuda, F. Kenny, J. Xu y J. S. Dooley, 2007. Cryptosporidiosis in developing countries. En: *J Infect Dev Ctries*, 1(3), pp.242-256.
- Sopwith, W., K. Osborn, R. Chalmers y M. Regan, 2005. The changing epidemiology of cryptosporidiosis in North West England. En: *Epidemiol Infect*, 133(5), pp.785-793.
- Strong, W. B., J. Gut y R. G. Nelson, 2000. Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products. En: *Infect Immun*, 68(7), pp.4117-4134.
- Sulaiman, I. M., P. R. Hira, L. Zhou, F. M. Al-Ali, F. A. Al-Shelahi, H. M. Shweiki, J. Iqbal, N. Khalid y L. Xiao, 2005. Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. En: *J Clin Microbiol*, 43(6), pp.2805-2809.
- Tanriverdi, S., J. C. Blain, B. Deng, M. T. Ferdig y G. Widmer, 2007. Genetic crosses in the apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum* define recombination parameters. En: *Mol Microbiol*, 63(5), pp.1432-1439.
- Thivierge, K., A. Iqbal, B. Dixon, R. Dion, B. Levesque, P. Cantin, L. Cedilotte, M. Ndao, J. F. Proulx y C. P. Yansouni, 2016. *Cryptosporidium hominis* Is a Newly Recognized Pathogen in the Arctic Region of Nunavik, Canada: Molecular Characterization of an Outbreak. En: *PLoS Negl Trop Dis*, 10(4), p.e0004534.
- Thompson, H. P., J. S. Dooley, J. Kenny, M. McCoy, C. J. Lowery, J. E. Moore y L. Xiao, 2007. Genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* spp. in neonatal calves in Northern Ireland. En: *Parasitol Res*, 100(3), pp.619-624.
- Tiranti, K., A. Larriestra, C. Vissio, N. Picco, F. Alustiza, A. Degioanni y A. Vivas, 2011. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp., spatial clustering



- and patterns of shedding in dairy calves from Cordoba, Argentina. En: *Rev Bras Parasitol Vet*, 20(2), pp.140-147.
- Tomazic, M. L., J. Maidana, M. Dominguez, E. L. Uriarte, R. Galarza, C. Garro, M. Florin-Christensen y L. Schnittger, 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from calves in Argentina. En: *Vet Parasitol*, 198(3-4), pp.382-386.
- Torres, M. E., M. C. Pirez, F. Schelotto, G. Varela, V. Parodi, F. Allende, E. Falconi, L. Dell'Acqua, P. Gaione, M. V. Mendez, A. M. Ferrari, A. Montano, E. Zanetta, A. M. Acuna, H. Chiparelli y E. Ingold, 2001. Etiology of children's diarrhea in Montevideo, Uruguay: associated pathogens and unusual isolates. En: *J Clin Microbiol*, 39(6), pp.2134-2139.
- Trotz-Williams, L. A., D. S. Martin, W. Gatei, V. Cama, A. S. Peregrine, S. W. Martin, D. V. Nydam, F. Jamieson y L. Xiao, 2006. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. En: *Parasitol Res*, 99(4), pp.346-352.
- Tyzzar, E. E., 1910. An extracellular Coccidium, *Cryptosporidium muris* (Gen. Et Sp. Nov.), of the gastric Glands of the Common Mouse. En: *J Med Res*, 23(3), pp.487-510 483.
- Tzipori, S. y G. Widmer, 2000. The biology of *Cryptosporidium*. En: *Contrib Microbiol*, 6, pp.1-32.
- UK Environment Agency, 2010. *The microbiology of drinking water. Part 14 - Methods for the isolation, identification and enumeration of Cryptosporidium oocysts and Giardia cysts*. Rotherham: Environment Agency
- Waldron, L. S., B. C. Ferrari, C. Cheung-Kwok-Sang, P. J. Beggs, N. Stephens y M. L. Power, 2011. Molecular epidemiology and spatial distribution of a waterborne cryptosporidiosis outbreak in Australia. En: *Appl Environ Microbiol*, 77(21), pp.7766-7771.
- Widmer, G. y Y. Lee, 2010. Comparison of single- and multilocus genetic diversity in the protozoan parasites *Cryptosporidium parvum* y *C. hominis*. En: *Appl Environ Microbiol*, 76(19), pp.6639-6644.
- Wielinga, P. R., A. de Vries, T. H. van der Goot, T. Mank, M. H. Mars, L. M. Kortbeek y J. W. van der Giessen, 2008. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. En: *Int J Parasitol*, 38(7), pp.809-817.
- Wilkes, G., N. J. Ruecker, N. F. Neumann, V. P. Gannon, C. Jokinen, M. Sunohara, E. Topp, K. D. Pintar, T. A. Edge y D. R. Lapen, 2013. Spatiotemporal analysis of *Cryptosporidium* species/genotypes and relationships with other zoonotic pathogens in surface water from mixed-use watersheds. En: *Appl Environ Microbiol*, 79(2), pp.434-448.
- Wingender, J. and H. C. Flemming, 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. En: *Int J Hyg Environ Health*, 214(6), pp.417-423.
- Wohlsen, T., J. Bates, B. Gray y M. Katouli, 2004. Evaluation of five membrane filtration methods for recovery of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from water samples. En: *Appl Environ Microbiol*, 70(4), pp.2318-2322.
- Wolyniak, E. A., B. R. Hargreaves y K. L. Jellison, 2009. Retention and release of *Cryptosporidium parvum* oocysts by experimental biofilms composed of a natural stream microbial community. En: *Appl Environ Microbiol*, 75(13), pp.4624-4626.
- Xiao, L., 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. En: *Exp Parasitol*, 124(1), pp.80-89.
- Xiao, L., K. Alderisio, J. Limor, M. Royer y A. A. Lal, 2000. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. En: *Appl Environ Microbiol*, 66(12), pp.5492-5498.
- Xiao, L., M. C. Hlavsa, J. Yoder, C. Ewers, T. Dearen, W. Yang, R. Nett, S. Harris, S. M. Brend, M. Harris, L. Onischuk, A. L. Valderrama, S. Cosgrove, K. Xavier, N. Hall, S. Romero, S. Young, S. P. Johnston, M. Arrowood, S. Roy y M. J. Beach, 2009. Subtype analysis of *Cryptosporidium* specimens from sporadic cases in Colorado, Idaho, New Mexico, and Iowa in 2007: widespread occurrence of one *Cryptosporidium hominis* subtype and case history of an infection with the *Cryptosporidium* horse genotype. En: *J Clin Microbiol*, 47(9), pp.3017-3020.
- Xiao, L., J. Limor, U. M. Morgan, I. M. Sulaiman, R. C. Thompson y A. A. Lal, 2000. Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. En: *Appl Environ Microbiol*, 66(12), pp.5499-5502.
- Xiao, L., L. Zhou, M. Santin, W. Yang y R. Fayer, 2007. Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States. En: *Parasitol Res*, 100(4), pp.701-706.
- Yu, J. R., S. U. Lee y W. Y. Park, 2009. Comparative sensitivity of PCR primer sets for detection of *Cryptosporidium parvum*. En: *Korean J Parasitol*, 47(3), pp.293-297.
- Zanetta, E., 1987. Primeros hallazgos en Uruguay de un nuevo agente de diarrea aguda infantil: *Cryptosporidium* sp. En: *Arch Ped Uruguay*, 58(1), pp.37-45.
- Zhao, G. H., Y. Q. Fang, U. Ryan, Y. X. Guo, F. Wu, S. Z. Du, D. K. Chen y Q. Lin, 2016. Dynamics of Th17 associating cytokines in *Cryptosporidium parvum*-infected mice. En: *Parasitol Res*, 115(2), pp.879-887.
- Zintl, A., A. F. Proctor, C. Read, T. Dewaal, N. Shanaghy, S. Fanning y G. Mulcahy 2009. The prevalence of *Cryptosporidium* species and subtypes in human faecal samples in Ireland. En: *Epidemiol Infect*, 137(2), pp.270-277.

# Evaluación in vitro del efecto tóxico de una formulación comercial de glifosato de amonio sobre cinco especies representantes de diferentes hábitats y niveles tróficos

## In vitro assessment of toxic effects of a commercial formulation ammonium salt of glyphosate over five species representing different trophic levels and habitats

Spósito, Martín (1), Espinola Molledo, Julio César (1)

(1) Laboratorio de Bioensayos del Servicio de Evaluación de la Calidad y Control Ambiental, SECCA, Intendencia de Montevideo, IM

Contacto: marspo@gmail.com

RECIBIDO: 8/8/2016 – APROBADO: 15/10/2016

### Resumen

Se evaluó el efecto tóxico agudo y crónico in vitro de glifosato de amonio sobre especies que ocupan diferentes niveles tróficos y ambientes físicos: bacterioplanctónicos (*Vibrio fischeri*), fitoplanctónicos (*Pseudokirchneriella subcapitata*), zooplanctónicos (*Daphnia magna*), zoobentónicos (*Hydra attenuata*) y terrestre (*Lactuca sativa*). Se partió del preparado comercial herbicida TryGlif, a base de glifosato sal de amonio con una concentración de 430gr/L en peso de glifosato, más los llamados coadyuvantes (dispersantes, emulsionantes, solubilizantes, etc.) que poseen un potencial tóxico independiente y generalmente sinérgico con el principio activo. De las cinco especies analizadas, la de mayor sensibilidad al compuesto fue *H. attenuata*, con un valor de Concentración Letal 50% (CL50) de 5,79 mg/L. De los cinco bioensayos considerados, la bacteria luminiscente *V. fischeri* fue la que obtuvo una concentración de efecto 50% (CE50) mayor, alcanzando 37,28 mg/L. El alga unicelular *P. subcapitata* tuvo una CL50 de 24,58 mg/L. La *D. magna* y la *L. sativa* presentaron valores similares de CL50 de 9,59 mg/L y 9,79 mg/L, respectivamente. Los efectos cuantificados sobre las diferentes especies analizadas aportaron un valor de referencia para siguientes investigaciones y se compararon con otros hallados en experimentos similares en la bibliografía internacional.

**Palabras clave:** TryGlif, herbicida, bioensayos, ecotoxicidad, aguas superficiales.

### Abstract

We evaluated the acute and chronic toxic effect in vitro of a commercial brand of ammonium salt of glyphosate over five species that occupy different trophic levels and physical environments: bacterioplankton (*Vibrio fischeri*), phytoplankton (*Pseudokirchneriella subcapitata*), zooplankton (*Daphnia magna*), zoobenthos (*Hydra attenuata*) and terrestrial (*Lactuca sativa*). This investigation assessed the commercial preparation of herbicide Try Glif, based on ammonium salt of glyphosate with a concentration of 430gr/L by weight of glyphosate, and inert compounds (dispersants, emulsifiers, solubilizers, etc.) with a potential toxicity is generally synergistic with the active principle. Among the five species tested the most sensitive to the compound was *H. attenuata*, with an LC50 of 5,79 mg/L. The luminescent bacterium *V. fischeri* was from the five bioassays that a median effective concentration scored higher, reaching 37,28 mg / L. The unicellular alga *P. subcapitata* had an LC50 of 24,58 mg/L. The *D. magna* and *L. sativa* had similar values of LC50 of 9,59 mg/L and 9,79mg/L respectively. Quantified effects on different species analyzed provide a baseline for further investigations and were compared to those found in similar experiments in the international literature.

**Keywords:** TryGlif, herbicide, bioassays, ecotoxicity, superficial waters.

## Introducción

El Glifosato (N-fosfometil glicina) es un herbicida no selectivo y post emergente. Es uno de los herbicidas de mayor uso en la agricultura, por su probada eficacia, fácil manejo y

su utilización en los modernos sistemas de cultivos (USDA, 2013). Su acción a nivel metabólico reside en la inhibición de la enzima 5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS),

que cataliza la reacción entre el ácido fosfoenolpirúvico y ácido 5-fosfochiquímico para sintetizar un precursor del ácido corísmico, en la vía del ácido chiquímico, que solo tiene lugar en plantas, bacterias y hongos (Martino, 1995). La enzima sobre la que actúa el glifosato es la responsable de la formación de los aminoácidos fenilalanina, triptofano y tirosina, que a la vez son utilizados para la formación de otros metabolitos secundarios.

La utilización de herbicidas basados en el glifosato ha aumentado considerablemente en cantidad, transformándose en nuestro país en el principal compuesto de su clase (REDES, 2012). Particularmente, su uso aumentó en el cultivo de algunas variedades a las cuales se les ha inducido genéticamente su resistencia (maíz, soja, entre otros). En Uruguay, un considerable aumento de la superficie cultivada y expuesta al uso de herbicidas ha tenido lugar en los últimos años. La superficie de cultivos de soja, el principal demandante de herbicidas a base de glifosato, aumentó desde el año 2003 al 2010 de 78,9 mil a 863,2 mil hectáreas, con un crecimiento de la producción que en ese mismo periodo pasó de 183 a 1816,8 mil toneladas anuales. Entre los años 2000 y 2011 las importaciones de herbicidas con base a este principio activo se multiplicaron por 7,5. Al final de este período la cantidad ascendía a 11253 toneladas anuales.

La investigación acerca de los efectos en las especies objetivo y no objetivo de herbicidas y pesticidas ha cobrado relevancia mundial, principalmente en los ejes de medicina, biodiversidad, evaluación de impacto ambiental y conservación de las aguas superficiales. Numerosos estudios (Alberdi, et al., 1996; Martin, et al., 2003; Martin y Ronco, 2006; Bonnet, et al., 2007; Sobrero, et al., 2007; Lallana, et al., 2013) han relevado la ecotoxicidad del principio activo glifosato, así como también de sus formulaciones comerciales, las cuales además del principio activo conllevan otros químicos mejoradores de la eficacia del glifosato (los más utilizados son los surfactantes, que colaboran en la adhesión del principio activo a los tejidos vegetales). En el año 1993 la US EPA clasificó al glifosato como una sustancia “no tóxica a moderadamente tóxica para aves, mamíferos e invertebrados acuáticos” (US EPA, 1993). Posteriores investigaciones han vinculado la exposición al glifosato o sus formulaciones con la incidencia de algunos tipos de cáncer en humanos (DeRoos, et al., 2003). Recientemente, la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer ha incorporado al glifosato en el grupo 2A de sustancias probablemente carcinogénicas en humanos (Guyton, et al., 2015). Más allá de estas preocupaciones mayores que involucran a la salud humana, los posibles efectos del glifosato y sus formulaciones en el ambiente cobran una relevancia mundial y creciente.

Asimismo, se han desarrollado herramientas bioanalíticas (bioensayos) capaces de evaluar el efecto tóxico de los millones de productos químicos registrados en el Chemical Abstract Service (CAS), formulaciones comerciales complejas o muestras ambientales de las cuales se presume toxicidad. Estos ensayos biológicos realizados en el laboratorio utilizan especies que representan diferentes niveles tróficos y hábitats de los ecosistemas. Los resultados obtenidos en el laboratorio sobre muestras ambientales y productos químicos son extrapolados al ecosistema con la finalidad de predecir el deterioro del mismo (Eagleson, et al., 1990). Para esta investigación se utilizaron especies que representan diferentes niveles tróficos y ambientes acuáticos y terrestres (Tabla 1).

Basados en una de las formulaciones aún no comercializadas en nuestro país (Try Glif - n° registro mgAP 4126) y en relevamientos previos de la presencia de glifosato en los cursos

Bioensayo/ organismo	Clasificación por hábitat	Nivel trófico
<i>Daphnia magna</i>	Zooplankton	Heterótrofo/ Consumidor primario
<i>Lactuca sativa</i> (var. Buttercrunch)	Terrestre	Autótrofo / Productor Primario
<i>Pseudokirchneriella</i> <i>subcapitata</i>	Fitoplancton	Autótrofo / Productor Primario
<i>Hydra attenuata</i>	Zoobentos	Heterótrofo/ Consumidor secundario
<i>Vibrio fischeri</i>	Bacterioplancton	Heterótrofo/ Detritívoro

Tabla 1. Especies utilizadas, sus ambientes físicos y niveles tróficos.

de agua (Nuñez, et al., 2012; Peruzzo, et al., 2003; Aparicio, et al., 2013), el objetivo de este trabajo es determinar la toxicidad aguda y crónica de la formulación comercial TryGlif de glifosato en sal de amonio para cuatro especies de organismos acuáticos y la planta vascular terrestre *Lactuca sativa* (variedad Buttercrunch). La incorporación de esta especie sirve como referencia de las plantas vasculares, las cuales son uno de los objetivos directos del herbicida. La letalidad es una consecuencia extrema de la exposición de un organismo a un compuesto o una muestra dada, mientras que los organismos pueden verse afectados en una cantidad innumerable de variables biológicas. Desde el punto de vista de los ensayos, en algunos casos es posible medir la mortalidad y sobre ella se elaboran el índice de concentraciones letales (CL). En los casos donde no se puede comprobar la mortalidad directamente o que ésta no tenga lugar en el punto final al que arriban los ensayos, puede medirse la variación respecto al control de alguna variable biológica y estimar el efecto que sobre ella tiene la exposición a la muestra. De esta última estimación se obtienen valores de concentraciones de efecto o efectivas (CE).

El objetivo del trabajo es determinar la concentraciones letales (CL50) o de efecto 50% (CE50) para cada una de las especies y comparar dicho valor con los valores conocidos de escorrentía en suelos donde fue utilizado el glifosato.

## Materiales y Métodos

### Preparación de la solución problema

La preparación de la solución del producto comercial de glifosato de amonio utilizado en los ensayos siguió los siguientes lineamientos:

- Las soluciones del producto analizadas fueron preparadas al momento de la realización de los diferentes bioensayos. Esta precaución se tomó para evitar el proceso natural de degradación vía hidrolítica que comienza a sufrir el principio activo en contacto con el agua.

- Los solventes utilizados para la preparación de los diferentes tratamientos se ajustaron a las exigencias de los protocolos aplicados con modificaciones especiales en cuanto a reducir la dureza de los solventes (agua ultrapura) para evitar la precipitación del principio activo, precaución que surgió de las indicaciones sugeridas por el fabricante.
- El criterio para la realización de las diferentes series de concentraciones ensayadas a las que fueron expuestas las especies utilizadas se basó en el trabajo de Nuñez et al. (2012) que indica la concentración del principio activo hallada sobre un curso de agua adyacente a varias parcelas con y sin tapiz vegetal, donde se aplicó glifosato a las dosis usuales recomendadas y sobre las cuales, a su vez, se aplicó riego con la finalidad de simular lluvia. De dicho experimento se obtuvieron valores de runoff de entre 0,15 y 3,5 mg/L a 24 horas post-aplicación.

### Bioensayo con *Lactuca sativa*

El ensayo con semillas de lechuga *Lactuca sativa* consiste en la exposición de la semilla a la solución problema midiendo la inhibición en el crecimiento radicular. El valor buscado es la concentración de efecto 50% (CE50), que es la responsable de la disminución en un 50% del crecimiento de la raíz respecto a su control negativo con agua dura. El agua dura utilizada para el control negativo fue el agua de la marca comercial Nativa (Milotur S.A.): cloruros 12 mg/L, calcio 64 mg/L, magnesio 32 mg/L, sodio 10,7 mg/L y potasio 1,1 mg/L. En duplicado, 10 semillas de *L. sativa* fueron colocadas en placas de Petri con filtros de papel embebidos en 4 mL de la solución problema y puestas en oscuridad a  $20 \pm 2$  °C por 120 horas.

### *Hydra attenuata*

Las Hydras fueron expuestas a distintas concentraciones de solución problema siguiendo los lineamientos del test agudo de Johnson et al. (1990) y Trotter, et al. (1997) por un plazo de 48 horas. Distribuidas de a tres hydras por poza en triplicado, en 4 mL de solución, al final del ensayo se cuenta la mortalidad de las hydras, entendida como la disgregación de los tejidos del animal o su inmovilidad luego de una acción mecánica.

### *Daphnia magna*

Los ensayos con *Daphnia magna* se realizaron siguiendo los lineamientos de la UNE-ISO 6341:1996 (Asociación Española de Normalización y Certificación, 1996). Cinco ejemplares de *D. magna* fueron expuestos por duplicado en pozas de 10 mL de solución por 48 horas. Se identificó la mortalidad constataando la parálisis cardíaca de los individuos expuestos. Tanto para la *H. attenuata* como para la *D. magna* la incubación fue realizada a  $20 \pm 2$  °C con un fotoperíodo de 8 horas de luz, 16 de sombra y el control negativo fue el agua comercial Nativa. El valor hallado en ambos casos fue la concentración letal 50 (CL50), que es la concentración de solución problema capaz de matar al 50% de los individuos expuestos.

### *Pseudokirchneriella subcapitata*

El bioensayo con *Pseudokirchneriella subcapitata* es de los cinco bioensayos el único que evalúa la toxicidad a la exposición crónica. Consiste en la medición de la inhibición del crecimiento

en un cultivo algal inoculado con distintas concentraciones de la solución problema. Las células fueron incubadas (10 µL cultivo algal a concentración conocida, 10 µL de medio Bold y 200 µL de muestra) en microplaca por un plazo de 72 hs a una temperatura de  $24 \pm 2$  °C y con luz permanente a 3000 lux por sextuplicado, con agitación permanente a 40 rpm. El control negativo se realizó inoculando el cultivo algal (10 µL cultivo algal y 10 µL de medio Bold) en agua bicarbonatada (200 µL de solución NaHCO<sub>3</sub> 15mg/L). Terminado el ensayo, las células fueron contadas en hemocitómetro de Neubauer y al igual que en el caso de la *L. sativa*, la CE50 es aquella que reduce en un 50% el número de células vivas respecto al control negativo pasadas las 72 hs del ensayo.

### Microtox®

El ensayo de Microtox corresponde a una técnica fotométrica que usa la respuesta a la exposición de tóxicos por parte de una bacteria marina bioluminiscente *Vibrio fischeri*. En la prueba la bacteria rehidratada es incubada durante 15 minutos a 15 °C junto con la muestra y sus diluciones. Luego, la luminiscencia producida por la bacteria fue medida en un lector Microtox 500M. El ensayo realizado es el protocolizado como 81,9% Basic Test con nueve diluciones seriadas al 1/2, partiendo de una solución inicial de 434 mg/L de glifosato en sal de amonio del formulado TryGlif. La toxicidad de la muestra se expresa como la concentración en % que inhibe el 50% (CE50) de la producción de luz a los 15 minutos de exposición al contaminante (Dutka, 1989).

### Análisis estadísticos

Para los ensayos de *D. magna* y *H. attenuata* el valor de la CL50 fue hallado por interpolación no lineal entre los valores de concentraciones próximos al 50% en el programa TOXCALC (Environment Canada, 2007). Esto se debe a la falta de mortalidad parcial suficiente para realizar un ajuste por el método PROBIT.

La CE50 para el bioensayo con *L. sativa* se determinó utilizando el programa STATA 12.1 (www.stata.com). Para ello fue necesario el ajuste de una regresión no lineal paramétrica. El cálculo de la CE50 para *P. subcapitata* se realizó por el método de ICP "A linear interpolation method for sublethal toxicity" (Norberg-King, 1993). Para la determinación de la CE50 en el ensayo de Microtox fue utilizado el programa Microtox Omni Software, de acuerdo al protocolo de Basic Test. La concentración de muestra que produce una reducción del 50% en la emisión de luz pasado los 15 minutos de exposición es la expresada como CE50.

### Resultados

De las cinco especies analizadas la de mayor sensibilidad a la fórmula comercial de sal de amonio de Glifosato (Triglif®) fue la *H. attenuata*, con un valor de CL50 de 5,79 mg/L y un intervalo de confianza del 95% (IC95%) igual a: 3,39 – 6,78 mg/L. La bacteria luminiscente *V. fischeri* fue de los cinco bioensayos el que obtuvo una mayor concentración de efecto 50, alcanzando 37,28 mg/L (IC95%: 9,86 – 141,05 mg/L; R<sup>2</sup>=0,82). El alga unicelular *P. subcapitata* tuvo una CL50 de 24,58 mg/L, con un intervalo de confianza de entre 21,61 y 26,97 mg/L. *D. magna* y *L. sativa* tuvieron valores similares de

CL50 de 9,59 mg/L (IC95%: 6,78 – 13,56 mg/L) y 9,79 mg/L (IC95%: 8,17 – 11,41 mg/L;  $R^2=0,89$ ), respectivamente (**Tabla 2**). Es de destacar que el valor de la CL50 perteneciente a la *D. magna* ya se había alcanzado a las 24 hs del ensayo y se mantuvo permanente hasta las 48 hs después de finalizado.

Especie	CL50/CE50	IC95%
<i>H. attenuata</i>	5,79	3,39 – 6,78
<i>D. magna</i>	9,59	6,78 – 13,56
<i>P. subcapitata</i>	24,58	21,61 – 26,97
<i>L. sativa</i>	9,79	8,17 – 11,41
<i>V. fischeri</i>	37,28	9,86 – 141,05

**Tabla 2.** Resultados obtenidos de la CL50/CE50 para las especies estudiadas en mg/L. El IC95% es el intervalo de confianza del 95%. \*Los valores de la CL50 en la *D. magna* son aquellos obtenidos a las 24 hs de iniciado el bioensayo.

## Discusión

Algunos de los valores de las CL50/CE50 para las distintas especies se encontraron en el mismo orden que otros estudios con similares características (**Tabla 3**).

De los valores obtenidos de CL50 podemos afirmar que las especies *H. attenuata*, *L. sativa* y *D. magna* resultaron las más sensibles a la exposición al glifosato en sal de amonio TryGlyf. Tanto el alga *P. subcapitata* como la bacteria fluorescente *V. fischeri* tienen una sensibilidad de efecto para este compuesto prácticamente de un orden menor respecto a las tres especies mencionadas anteriormente.

La alta disparidad de los valores de las CL50/CE50 para las diversas especies según los diferentes autores puede ser producto de las distintas formulaciones comerciales con las que se realizaron los bioensayos. A esta conclusión han llegado otros autores como Lallana et al. (2013), que encontraron diferencias significativas en el crecimiento radicular de *L.*

*sativa* en el tratamiento con dos formulaciones comerciales distintas con la misma cantidad de principio activo.

Las formulaciones comerciales tienen además del principio activo glifosato una sal asociada y coadyuvantes (los más usados son los surfactantes). En cuanto a estos últimos se ha demostrado que pueden ser de mayor toxicidad que el principio activo, su sal asociada y sus principales productos de hidrólisis y degradación en el medio acuoso (Martin, et al., 2003). Este aspecto debería redireccionar el área de investigación vinculada al uso del glifosato. Parece más importante evaluar el efecto tóxico y las consecuencias sobre el ambiente y la salud humana de los coadyuvantes que contienen las formulaciones de herbicidas basados en glifosato antes que el propio principio activo.

Los valores de la CL50/CE50 para las distintas especies están todas al menos un orden de magnitud por encima de las concentraciones encontradas del compuesto activo en aguas superficiales de escorrentía o de cursos de agua cercanos o linderos con los cultivos en los cuales se han aplicado herbicidas basados en el glifosato (Peruzzo, et al., 2008; Nuñez, et al., 2012; Aparicio, et al., 2013). De todas formas, esto no significa que las cantidades encontradas tanto de este tipo de herbicidas como de otros compuestos no tengan efectos en la composición y diversidad biológica de los ecosistemas acuáticos. Pequeñas variaciones en las poblaciones de una especie o de un nivel trófico pueden engendrar reacciones a distintos niveles que alteran drásticamente el funcionamiento global del sistema (Relyea, 2005; Pérez, et al., 2011). Del mismo modo, los efectos subletales, que implican una importante variación de algunas de las medidas vitales de los individuos (movilidad, reproducción, enraizamiento, entre otras), podrían engendrar una alteración de consecuencias sistémicas (Mensah, et al., 2012 y 2014). Este estudio evalúa mayoritariamente los efectos agudos que son consecuencia a una alta exposición a los tóxicos evaluados, pero no se puede predecir en base a estos resultados las consecuencias de una exposición subcrónica o crónica, la que suele tener una sensibilidad mayor (van Gestel, et al., 2001).

Es posible afirmar finalmente que estos ensayos se muestran como una herramienta biológica válida para evaluar los efectos tóxicos ambientales residuales producidos por esta formulación comercial a las concentraciones testeadas en este trabajo.

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. magna</i>	<i>H. atenuatta</i>	<i>L. sativa</i>	<i>V. fischeri</i>
Spósito et al. (2015) (mg/L de Gly en sal de amonio)	24,58	9,59	5,79	9,79	37,28
IUPAC (mg/L de Gly)	4,4	40			
Suprenant (1981) (mg/L de Gly en IPA sal)		5,3			
Alberdi (1996) (48% de Gly en sal de IPA y 15% de surfactante)		95,96			
Martin y Ronco (2006) (RoundUp Max mg/L de p.a.)				7,3	
Martin (2003) (mg/L de Gly en sal de amonio) (RoundUp Max mg/L de p.a.)	41				162
Lallana (2013) (mg/L de Gly en sal de amonio)				668,2	
Folmar et al. (1979) (RoundUp Max mg/L de p.a.)		3			

**Tabla 3.** Valores de CL50/ CE50 hallados en este trabajo y por otros autores para los respectivos compuestos que contienen glifosato como principio activo. GLY en IPA sal: glifosato en sal de isopropilamina. RoundUp y RoundUp Max son productos comerciales con el principio activo glifosato.

## Reconocimientos

Se agradece al Quím. Andrés Pérez por proporcionar el glifosato utilizado en el presente estudio y contribuir en la determinación del diseño experimental.

Se agradece al Ing. Agr. Saturnino Nuñez por proporcionar información de antecedentes de estudios de campo y contribuir en la determinación del diseño experimental.

## Referencias

- Asociación Española de Normalización y Certificación, 1996. UNE-ISO 6341: *Calidad de agua. Determinación de la inhibición de la movilidad de Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea). Ensayo de toxicidad aguda*. Madrid: AENOR.
- Alberdi, J.L., Sáenz, M.E., Di Mazio, W.D., Tortorelli, M.C., 1996. Comparative acute toxicity of two herbicides, paraquat and glyphosate, to *Daphnia magna* and *D.spinulata*. En: *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57, pp.229–235.
- Aparicio, V.C., et al., 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. En: *Chemosphere*, 93(9), pp.1866–1873.
- Bonnet, J.L., Bonnemoy, F., Dusser, M. y Bohatier, J., 2007. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to non target cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate. En: *Tetrahymena pyriformis, Environ. Toxicol.*, 22(1), pp.78–91.
- De Roos, A. J., Zahm, S., Cantor, K., Weisenburger, D., Holmes, F., Burmeister, L. y Blair, A., 2003. Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. En: *Occupational and Environmental Medicine*, 60(9), e11.
- Dutka, B.J., 1989. *Methods for microbiological and toxicological analysis of waters, wastewaters, and sediments*. Ontario: Ed. Rivers Research Branch, NWRI, CCIW, Burlington.
- Eagleson, K.W., Lenat, D.L., Ausley, L.W. y Winborne, F.B., 1990. Comparison of measured instream biological responses with responses predicted using the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. En: *Environ. Toxicol. Chem.*, (9), pp.1019–1028.
- Environment Canada, 2007. *Guidance document in statistical methods for environmental toxicity tests*. Ottawa: Environment Canada. (Report EPS 1/RM/46).
- Folmar, L.C., Sanders, H.L. y Julin, A.M., 1979. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. En: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 8(3), pp.269–278.
- Guyton, K.Z., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Scoccianti, C., Mattock, H. y Straif, K., 2015. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. En: *Lancet Oncol.*, 16(5), pp.490–1.
- Johnson, E.M., Gabel, B.E.G, Newman, L.M. y Giacobbe, R., 1990. *The Hydra assay manual. A practical guide to supplies, techniques and mechanics of the assay*. Filadelfia: Department of Anatomy, Daniel Baugh Institute, Jefferson Medical College.
- Lallana, María del C., et al., 2013. Determinación de reducción del crecimiento radical (CE50) por una formulación de glifosato utilizando lechuga y trigo como especies bioindicadoras [En línea]. En: *Rev. Fac. Cienc. Agrar., Univ. Nac. Cuyo*, 45(1). [Consulta: enero de 2015]. Disponible en: [http://revista.fca.uncu.edu.ar/images/stories/pdfs/2013-01/T45\\_01\\_13\\_Lallana.pdf](http://revista.fca.uncu.edu.ar/images/stories/pdfs/2013-01/T45_01_13_Lallana.pdf)
- Martin, M.L., Sobrero, M.C., Rivas, C., Rimoldi, F. y Ronco, A., 2003. Impacto del uso de pesticidas asociado a la siembra directa sobre especies no-blanco: flora riparia y acuática. En: *Memorias de la Conferencia Internacional Usos Múltiples del Agua*. Cartagena de Indias: Universidad del Valle.
- Martin, M.L. y Ronco, A.E., 2006. Effects of mixtures of pesticides used in the direct seedling technique on non-target plant seeds. En: *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 77(2), pp.228–236.
- Martino, D.L., 1995. *El herbicida glifosato: su manejo más allá de la dosis por hectárea*. Montevideo: INIA. (Serie Técnica, no. 61).
- Mensah, P.K., Muller, W.J., y Palmer, C.G., 2011. Acute toxicity of Roundup (R) herbicide to three life stages of the freshwater shrimp *Caridina nilotica* (Decapoda: Atyidae). En: *Phys Chem Earth*, 36, pp.905–909.
- Mensah, P.K., Palmer, G. y Muller, Wilhelmine J., 2014. Using growth measures in the freshwater shrimp *Caridina nilotica* as biomarkers of Roundup® pollution of South African freshwater systems. En: *Phys Chem Earth*, (50–52), pp.262–268
- Mensah, Paul, K., C., Palmer, G. y Wilhelmine J. Muller, 2014. Lethal and sublethal effects of pesticides on aquatic organisms: the case of a freshwater shrimp exposure to Roundup® [En línea]. Soloneski, Sonia ed. *Pesticides - toxic aspects*. [s.l.]: InTech. ISBN: 978-953-51-1217-4. DOI: 10.5772/57166. [Consulta: noviembre de 2015]. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-toxic-aspects/lethal-and-sublethal-effects-of-pesticides-on-aquatic-organisms-the-case-of-a-freshwater-shrimp-expo>
- Norberg-King, T.J., 1993. *A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (ICP) approach*. Minnesota: US EPA. (Technical report 03–93).
- Nuñez, S., Maeso, D., Franchi, S., Fiorentino G., Chouhy A., Ferrazzini, H., Fernandez A., Takahashi, S. y Gonda, G., 2012. *Evaluación del escurrimiento superficial de plaguicidas en suelos agrícolas representativos del país*. Montevideo: INIA, JICA, mgAP
- Pérez, G.P., Vera, M.S. y Miranda, L., 2011. Effects of herbicide glyphosate and glyphosate-based formulations on aquatic ecosystems [En línea]. En: Kortekamp, A. ed., *Herbicides and environment*. [s.l.]: InTech. ISBN 978-953-307-476-4. DOI: 10.5772/12877. [Consulta: noviembre de 2015]. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-and-environment/effects-of-herbicide-glyphosate-and-glyphosate-based-formulations-on-aquatic-ecosystems>
- Peruzzo, P., Marino, D., Cremonte, C., da Silva, M., Porta, A. y Ronco, A., 2003. *Impacto de pesticidas en aguas superficiales y sedimento asociado a cultivos por siembra directa*. *Memorias Conferencia Internacional Usos del Agua, Cartagena de Indias*. Cartagena de Indias: IWA. pp.135–142.
- Peruzzo, P.J., Porta, A.A., Ronco, A.E., 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils

- associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. En: *Environ. Pollut.*, 156(1), pp.61-66.
- REDES, 2012. *Crecimiento de la agricultura y el uso de agrotóxicos en Uruguay* [En línea]. Montevideo: Redes Amigos de la Tierra – Uruguay. [Consulta: noviembre de 2015]. Disponible en:  
<http://www.redes.org.uy/wp-content/uploads/2014/01/Folleto-Agr-y-Agrotoxicos-Redes-WEB.pdf>
- Relyea, R. A., 2005. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. En: *Ecol. Appl.*, 15(2), pp.618-627.
- Sobrero, M.C., Rimoldi, F., Ronco, A.E., 2007. Effects of the glyphosate active ingredient and a formulation on Lemma gibba L. at different exposure levels and assessment end-points. En: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 79, pp.537-543.
- Trottier, S., Blaise C., T. Kusui y E.M. Johnson, 1997. Acute toxicity Assessment of Aqueous Samples Using a Microplate-based Hydra attenuata Assay. En: *Environmental Toxicology and Water Quality*, 12, pp.265-271.
- U.S. Department of Agriculture Economic Research Service, USDA ERS, 2013. *Adoption of genetically engineered crops in the U.S. Washington, DC.* [En línea]. Washington: USDA ERS. [Consulta: octubre de 2015]. Disponible en: [www.ers.usda.gov/data-products/adoption-of-genetically-engineered-crops-in-the-us.aspx#](http://www.ers.usda.gov/data-products/adoption-of-genetically-engineered-crops-in-the-us.aspx#). UeRCQW0fhIQ
- US EPA, 1993. *R.E.D. Facts: glyphosate*. Washington: US EPA, p.7.
- US EPA, 1996. *Ecological effects test guidelines. Seed germination/root elongation toxicity test*. Minnesota: US EPA. (OPPTS 850.4200).
- van Gestel, C. A. M., van der Waarde, J. J., Derksen, J. G. M., van der Hoek, E. E., Veul, M. F. X. W., Bouwens, S., Rusch, B., Kronenburg, R., y Stokman, G. N. M., 2001. The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils. En: *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, pp.1438-1449.

REVISIÓN

# Tecnologías de control de floraciones de cianobacterias y algas nocivas en cuerpos de agua, con énfasis en el uso de irradiación por ultrasonido

## Technologies for the control of harmful cyanobacteria and algal blooms in waterbodies, with emphasis in the use of ultrasound irradiation

Míguez, Diana (1)

(1) Programa Aguas, Proyectos Ambientales, Gerencia I+D+i, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU.

Contacto: dmiguez@latu.org.uy

RECIBIDO: 21/11/2016 – APROBADO: 21/12/2016

### Resumen

Esta revisión sintetiza las ventajas y desventajas de los métodos de control de floraciones de cianobacterias y algas nocivas y/o de sus toxinas en cursos de agua o en agua potable. En los últimos años, las floraciones, o sea, el crecimiento desmedido de cianobacterias, han aumentado en extensión y frecuencia en el mundo y los riesgos ambientales y sanitarios por la potencial producción de toxinas. Además, la concomitante disminución de los niveles de oxígeno disuelto en las aguas afecta los ecosistemas, implicando a veces la mortandad de peces. Los métodos utilizados para el control y la remediación de las floraciones incluyen: los químicos, para destruir las células, o disminuir los niveles de fósforo y otros nutrientes en agua y en sedimentos; los biológicos, basados en la relación predador-presa, y los físicos, que atacan la estructura celular, su flotabilidad o viabilidad. Entre estos últimos se incluye la tecnología de ultrasonido, que también puede involucrar la generación de radicales libres. Este último método es promisorio, pero requiere continuar investigando para evaluar su eficiencia e inocuidad. También se hace referencia a los proyectos emprendidos en el marco del Programa Aguas LATU/Latitud, utilizando irradiación por ultrasonido en un tamar y un estanque eutrofizados.

**Palabras clave:** Floraciones de algas y cianobacterias nocivas, ultrasonido, eutrofización, restauración de lagos, ecotoxicidad.

### Abstract

This review summarizes the advantages and disadvantages of methods of control of harmful algal and cyanobacterial blooms and/or their toxins in watercourses or in drinking water. In recent years, the blooming phenomena, or the excessive growth of cyanobacteria, have increased in extent and frequency around the world, involving increasingly higher environmental and health risks due to the potential production of toxins. In addition, the concomitant decrease in the levels of dissolved oxygen in waters cause effects on the ecosystems that could even lead to fish mortality events. The methods used to control and remediate the blooms range from chemicals to destroy the cells or they focus on reducing the concentration of phosphorus and other nutrients in the water and sediments, to biological based on predator-prey relationships, and to physical methods, aimed to attack the cell structure, affect its buoyancy or their viability, including among them the ultrasound technology, of promising applicability, but requiring further research to evaluate its efficiency and safety. A reference is made to research projects undertaken in the framework of the LATU/Latitud Water Program, by applying ultrasound irradiation in an eutrophic excavated lagoon and in a pond.

**Keywords:** Harmful algal and cyanobacterial blooms, ultrasound, eutrophication, lake restoration, ecotoxicity.



## Tabla de contenidos

<b>Introducción</b> . . . . .	<b>55</b>
<i>Prevalencia mundial de las floraciones de cianobacterias nocivas y de los brotes de toxicidad</i> . . . . .	56
<i>Antecedentes de eutrofización y floraciones de algas y cianobacterias nocivas en Uruguay</i> . . . . .	56
<b>Métodos</b> 57	
<i>Tratamientos para el control de cianobacterias y algas</i> . . . . .	57
<i>Tratamientos de remoción de las cianotoxinas</i> . . . . .	57
<i>Características de la tecnología de ultrasonido y sus mecanismos de acción</i> . . . . .	58
<b>Resultados</b> . . . . .	<b>60</b>
<i>Avances del plan de proyecto de demostración de la tecnología de ultrasonido en el marco del Programa Aguas LATU/Latitud</i> . . . . .	60
<b>Conclusiones</b> . . . . .	<b>60</b>
<b>Reconocimientos</b> . . . . .	<b>60</b>
<b>Referencias</b> . . . . .	<b>60</b>

## Introducción

Las cianobacterias o algas verde-azules se encuentran en muchos ecosistemas acuáticos. Las floraciones de cianobacterias nocivas pueden impartir malos sabores al agua o incluso contaminarla con toxinas. Estas floraciones consisten en el crecimiento excesivo dominado por una o múltiples especies y constituyen un peligro ambiental a causa de la posible liberación de cianotoxinas en ciertas condiciones ambientales (Chorus y Bartram, 1999). Las condiciones ambientales que pueden promover el crecimiento de cianobacterias y la producción de cianotoxinas son la concentración de nutrientes que cuando se encuentran en exceso promueven la eutrofización, la temperatura del agua, la intensidad lumínica, la salinidad, el movimiento del agua, etcétera. La incidencia de las floraciones de cianobacterias en aguas superficiales ha aumentado en las últimas décadas por el aporte excesivo de nutrientes debido a prácticas agrícolas intensivas, a los vertidos de aguas residuales y en muchos países al uso de fosfatos en detergentes (Kundu, et al., 2015), eventos posiblemente agravados por el cambio climático (Wells, et al., 2015).

Las cianotoxinas se producen principalmente en forma intracelular durante la fase de crecimiento exponencial. La liberación de toxinas en el agua puede ocurrir durante la muerte o senescencia celulares pero también puede ser debido a las circunstancias evolutivas derivadas o ambientalmente mediado como alelopatía o limitación de nutrientes relativamente repentina. Cuando las cianotoxinas se liberan después de la muerte celular lo hacen a través de flujo pasivo del contenido celular o de la célula lisada. En consecuencia, cuando existen floraciones de cianobacterias en recursos de agua potable, el tratamiento debería eliminar cianobacterias pero evitar la lisis celular y la liberación de toxina posterior de cianotoxinas al medio acuático (Merel, et al., 2013).

Las microcistinas, toxinas peptídicas cíclicas, son las más ampliamente distribuidas. La microcistina-LR es la variante más tóxica, pero hay un amplio rango que incluye

además neurotoxinas y dermatotoxinas. Según la Agencia Ambiental de Estados Unidos, las floraciones de cianobacterias pueden ocasionar envenenamiento en ganado, peces y fauna silvestre (USEPA, 2015).

La exposición humana a cianobacterias y sus productos biológicamente activos es posible durante los deportes acuáticos y actividades de agua, o por la ingestión de agua contaminada. La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015) menciona los efectos en el ser humano, que incluyen irritaciones de la piel, los ojos, la boca y la nariz, dolor de estómago, de garganta, de cabeza, musculares, vómitos, fiebre, alergia, asma y urticaria, y afecciones de gravedad tales como hepatotoxicidad, nefrotoxicidad o efectos en el sistema nervioso. Estos efectos pueden ser de distinta gravedad por ingestión de las toxinas, por contacto dérmico o a través de diálisis. Así, por ejemplo, uno de los más graves casos de envenenamiento humano ocurrió en Brasil en 1996, cuando una floración de *Microcystis* en un depósito de agua de suministro contaminado con microcistinas en una clínica de tratamiento de hemodiálisis tuvo como resultado 56 muertes (Azevedo, et al., 2002). También hay un reporte de intoxicación aguda que requirió hospitalización por inmersión en una floración intensa existente en la represa de Salto Grande. La floración poseía un nivel de 48,6 µg/L de microcistina-LR (Giannuzzi, et al., 2016).

Aunque la gran mayoría de productos dañinos de cianobacterias está confinada al interior de las células, estos finalmente se liberan en el agua circundante después de la muerte celular natural o artificialmente inducida. Hasta la fecha, más de 100 diferentes congéneres de microcistina han sido caracterizados y se nombran según el código de la letra de los aminoácidos incorporados en las posiciones dos y cuatro; por ejemplo, microcistina-LR contiene leucina (L) en posición dos y arginina (R) en la posición cuatro. Las microcistinas se pueden introducir en los tejidos de los organismos a través

de la dieta o por la ingestión de agua contaminada, luego de lo cual se acumulan en el hígado mediante el sistema de transporte de ácidos biliares, variando su toxicidad de acuerdo a la combinación de los aminonúcleos en las dos posiciones variables del anillo peptídico (Schmidt, et al., 2014). Su toxicidad se manifiesta como un enlace covalente que se forma entre la toxina y las fosfatasa proteicas, especialmente en los hepatocitos, conduciendo a daños estructurales en las células y enfermedad hepática y del riñón.

Estas sustancias han sido clasificadas como posibles carcinógenos para órganos blancos: hígado y colon pertenecientes al Grupo 2B por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, 2010). Para el agua potable, la Organización Mundial de la Salud ha recomendado un valor guía provisional de 1 µg/L total de microcistina-LR en agua para el consumo (OMS, 2011).

Los niveles de nutrientes y la luz parecen ser factores limitantes en el control de la síntesis de microcistinas. La gran oxigenación que se produce en la superficie puede generar condiciones oxidantes para las células y algunas hipótesis indicarían que las microcistinas actuarían como antioxidantes. Además de *Microcystis spp.*, hay especies tales como *Aphazimemon spp.* que producen variadas cianotoxinas: cilindrospermopsina, anatoxina-a, saxitoxina y beta-metilamino-L-alanina, (BMAA) (USEPA, 2015). La BMAA es una toxina que también es producida por otras especies de cianobacterias tales como *Nostoc* y se ha vinculado a la generación de procesos neurodegenerativos tales como los de la enfermedad de Alzheimer, evidenciados por la posible relación causa efecto en la población Chamorro de la isla de Guam, quienes podrían tener contacto con la toxina a través de la dieta, ya que las plantas cícaras bioacumulan esa toxina en sus semillas por la existencia de *Nostoc* en simbiosis con sus raíces. Los murciélagos Fanihi (*Pteropus mariannus mariannus*, Pteropodidae) consumen esas semillas y bioacumulan la toxina en sus tejidos y, a su vez, estos animales son consumidos por los pobladores, lo cual sería una posible ruta de intoxicación, además de la ingestión de recetas que tienen en su preparación harina de estas semillas (Banack, et al., 2006). En Norteamérica se detectó una correlación entre los casos de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica con el BMAA presente en tejido cerebral analizado *post mortem* en pacientes afectados (Pablo, et al., 2009).

Como reseñan Harke et al. (2016), tradicionalmente las reducciones de los aportes de P han sido el foco para el control de las floraciones cianobacterianas basadas en la premisa de que pueden cumplirse fuentes de N por fijación de nitrógeno. Como *Microcystis* es incapaz de abastecer sus requerimientos de N por fijación de N<sub>2</sub>, el crecimiento y la proliferación de *Microcystis* dependen exclusivamente de fuentes externas de N generadas por diversas actividades humanas, cuya ocurrencia natural puede ser aumentada marcadamente, incluyendo la agricultura, la urbanización y la contaminación industrial, o debido a la regeneración interna de formas combinadas de N, principalmente como amonio. De modo que la proliferación mundial de *Microcystis* se encuentra relacionada a aumentos tanto de P como de N debido a la expansión de las actividades humanas. Esto, combinado con el hecho de que la mayoría de los sistemas eutróficos son muy turbios, lo que ocasiona una potencial limitación de la penetración de la luz, favorece las floraciones de cianobacterias. Estas pueden regular su flotabilidad y, o bien migrar verticalmente, hundiéndose para acceder a las aguas del fondo ricas en nutrientes, o bien

flotar en forma de floraciones superficiales, optimizando así la utilización de energía radiante.

## Prevalencia mundial de las floraciones de cianobacterias nocivas y de los brotes de toxicidad

Las floraciones de cianobacterias tóxicas son eventos que ocurren cada vez más comúnmente en cuerpos de agua en todo el mundo, especialmente en las zonas templadas o tropicales, debido a la industrialización y a la agricultura intensiva. Se debe seguir investigando cómo se afectarán por el cambio climático las condiciones en cuanto a ingresos de fósforo y de nitrógeno hacia las aguas costeras y las cuencas y si esto produciría una exacerbación de las floraciones (Paerl, 2016). Una de las cianobacterias formadoras de floración más generalizadas en ecosistemas de agua dulce es *Microcystis spp.*, la que sobrevive al invierno en el bentos y durante el verano se eleva hasta el *epilimnion*, donde puede acumularse y forma floraciones y espumas en la superficie del agua.

En los países desarrollados el problema de las floraciones de cianobacterias nocivas es aún de mayor magnitud que en nuestra región. Por ejemplo, en Estados Unidos el Gobierno Federal informó en el año 2008 sobre un plan de gestión que incluía también los impactos económicos y socioculturales. Además, comprendía un relevamiento de acciones de monitoreo, predicción y control. También recomendaba una gestión de respuesta con alto grado de coordinación entre investigadores, gestores, tanto de salud pública como ambientales, y agencias federales y establecía incentivos económicos (López, et al., 2008). Aun así, en agosto de 2014 un evento de floración dejó a la población de la ciudad de Toledo, Ohio, sin agua potable durante varios días, debido al nivel de cianotoxinas detectadas en ella, lo cual, según entienden Ho y Mi (2015), debería motivar el desarrollo de modelos estadísticos o mecánicos para entender mejor los factores causales. Este evento dio por resultado la promulgación de decretos presidenciales que mandataron a la Agencia Ambiental EPA a tomar acciones aún más enérgicas y límites más estrictos para cianotoxinas en agua, con niveles diferenciales más exigentes para niños.

## Antecedentes de eutrofización y floraciones de algas y cianobacterias nocivas en Uruguay

En nuestro país, el Proyecto Algas financiado por LATU a través de convocatoria abierta evaluada por ANII fue un proyecto interinstitucional entre Facultad de Ciencias, Instituto Clemente Estable y LATU. Entre sus resultados cuantificó los nutrientes del agua y los genes de las toxinas y las toxinas de algas y cianobacterias nocivas en el Río Uruguay y en el Río de la Plata, desde Salto a Punta del Este, generando además un protocolo de gestión (Kruk, et al., 2015). La situación en cuanto a eventos de floración algales ha sido cada vez más frecuente en los últimos tiempos y se han detectado muchos cuerpos de agua con esta problemática, especialmente durante la estación estival, lo que ha obligado a la empresa estatal potabilizadora, Obras Sanitarias del Estado (OSE), a tener que cambiar las tecnologías de potabilización que incluyen utilizar carbono activado y otros, y ha llevado al gobierno a decretar medidas de control y de gestión.

## Métodos

### Tratamientos para el control de cianobacterias y algas

Las células se pueden eliminar mediante lisis limitada por procesos físicos como la clarificación o filtración de membrana y posterior remoción mecánica, pero también mediante agregado de sustancias químicas o por biomanipulación. En base a la información suministrada por la USEPA (2015) y otras fuentes bibliográficas señaladas, la siguiente es la descripción de los principales métodos existentes:

#### Métodos físicos

##### Aireación

Por medio del uso de aireadores que bombean aire a través de difusores se llevan las células a la superficie del agua. Es útil para pequeños estanques. Generalmente son más eficientes en aguas profundas.

##### Manipulaciones hidrológicas

El objetivo es interrumpir el proceso de estratificación de la columna de agua. Son fáciles de implementar en sistemas controlados (embalses, plantas de tratamiento), pero requieren volumen de agua suficiente como para controlar el caudal y pueden ser caros y afectar otros organismos.

##### Mezcla mecánica

Otro tratamiento de gran escala es usar la cavitación hidrodinámica mediante chorros a presión. De acuerdo a Wu et al. (2011), el tratamiento con un equipo llamado Sonolator (Sonic Corporation, USA) para tratar suspensiones de algas produjo un decrecimiento de 80% en su crecimiento. Se puede combinar con luz UV y filtros de fibra de vidrio, por ejemplo, para lograr tratamientos de agua para ciclos cerrados. Son mezcladores que llevan hacia abajo a las cianobacterias. Su uso está extendido en Estados Unidos, pero para pequeñas áreas.

##### Desecación

Se usa en embalses y consiste en desecar parte del agua y colocar nueva. Sus impactos ambientales pueden ser considerables.

##### Retiro de las espumas

Se usan equipos que extraen las espumas, en general junto con floculantes o coagulantes.

##### Ultrasonido

Se utiliza un equipo de irradiación de ultrasonido a frecuencias tales que destruyan la estructura celular interna de la cianobacteria al romper las vesículas de gas internas que usan para flotación. Es útil en pequeños estanques o tajamares. No utiliza sustancias químicas y suele no ser caro. Su efectividad depende de la geometría del cuerpo de agua y de las especies de cianobacterias. Se requiere mayor investigación. Se presenta más información sobre este método en el punto 2.3.

#### Métodos químicos

Los antecedentes de tratamientos de control de algas usados a nivel internacional incluyen el agregado de aditivos químicos o biológicos para provocar su floculación (sulfato de cobre o de aluminio, paja de cebada envejecida, arcillas, o agregado de patógenos naturales tales como bacterias, virus y parásitos) (López, et al., 2008). Sin embargo, estos procedimientos pueden agregar compuestos nocivos para el medio ambiente o requerir mucho trabajo en su implementación. Incluyen

alguicidas a base de cobre (sulfato de cobre, permanganato de potasio, cloro, cal, etcétera). Sus riesgos son lisar las células y dejar en libertad las toxinas, por lo que se suelen usar al comienzo de las floraciones. Algunos de ellos son también tóxicos para el zooplancton, otros invertebrados y los peces. Existen también experiencias con paja de cebada que, según se ha estudiado, produce sustancias alguicidas durante su fermentación. Se ha utilizado en el Reino Unido con resultados positivos y puede producir mortandad de peces por la degradación de la materia orgánica.

##### Coagulantes

Los coagulantes se pueden usar para sedimentar las células en el fondo, donde no les llega la luz. En algunos casos pueden lisar las células y liberarse toxinas.

##### Floculantes

Los floculantes facilitan la sedimentación en el fondo anóxico, limitando los niveles de nutrientes.

##### Oxígeno

La oxigenación hipolimnética es una técnica que introduce un exceso de oxígeno para evitar que se liberen los nutrientes desde el sedimento, pero es relativamente cara. Gerling et al. (2014) estudiaron la aplicabilidad de esta tecnología y concluyeron que es adecuada para tratar cuerpos de agua poco profundos.

#### Métodos biológicos (biomanipulación y biodegradación)

##### Humedales flotantes artificiales

Las plantas flotantes consumen los nutrientes y luego se cosechan. El método se puede implementar en pequeños cuerpos de agua pero tiene éxito limitado.

##### Presión de pastoreo aumentada

Este método incluye la remoción de peces que comen plancton o la introducción de zooplancton. Es menos agresivo ambientalmente que otros, pero podría afectarse la biodiversidad y requiere monitoreo continuo. Es adecuado para aguas poco profundas. También se puede incrementar la competición por recursos introduciendo otros productores primarios tales como macrofitas, para limitar el fósforo disponible y el crecimiento de las cianobacterias.

Un retiro suficientemente extenso de peces que comen plancton y bentos fue considerado por Søndergaard et al. (2008) como una herramienta eficaz para crear agua clara; sin embargo, podría requerirse repetir el procedimiento para obtener efectos a largo plazo en lagos ricos en nutrientes. Un efecto secundario importante de biomanipulación de lagunas es la disminución de las concentraciones de fósforo y nitrógeno que en sus estudios disminuyó sus concentraciones en cerca del 50% de los niveles iniciales.

#### Tratamientos de remoción de las cianotoxinas

Los efectos de microcistinas y otras cianotoxinas sobre la salud requieren métodos de tratamiento eficaces para su eliminación en agua de consumo. Se las puede remover por adsorción en carbón activado, por ósmosis inversa, o por oxidación química, a través de la ozonización o cloración. En Estados Unidos se observó que la remoción de las células de cianobacterias era muy buena en plantas de potabilización pero que las del tipo filamentoso, especialmente *Aphanizomenon*, podrían eventualmente pasar los filtros y

encontrarse en agua potable (Szlag, et al., 2015). Los métodos de membranas de ultrafiltración y de nanofiltración y los de oxidación avanzada son promisorios (He, et al., 2016). La biodegradación de las microcistinas ocurre en condiciones aerobias en aguas superficiales, filtros de arena y efluentes cloacales. Por ejemplo, existen bacterias tales como una cepa de *Sphingomonas sp.* que degrada la microcistina-LR usando tres enzimas, incluyendo una microcistinasa.

## Características de la tecnología de ultrasonido y sus mecanismos de acción

Según describe Dehghani (2016), las ondas ultrasónicas causan un gradiente de presión, cavitación y burbujas que por la vibración alcanzan un cierto diámetro a longitudes de onda ultrasónicas (6  $\mu\text{m}$  de diámetro, 1 MHz frecuencia) y causan resonancia y mayores amplitudes de oscilación. Además de las grandes variaciones de presión en las burbujas, se producirían radicales libres. Se produce cavitación estable y cavitación de transición que solamente ocurre a altas energías de ultrasonido. Los efectos del ultrasonido en el crecimiento de las células dependen del tiempo, la frecuencia y la potencia. A alta frecuencia (1.7 MHz) se producen radicales libres de alta potencia, causando daños estructurales en las células y en la clorofila-a. A bajas frecuencias (20 kHz) y baja potencia también tiene como resultado la destrucción de células. Los radicales hidroxilos juegan un papel importante en la degradación de las toxinas tras la irradiación por ultrasonido.

Ha sido afirmado por proveedores de equipos que las paredes celulares de las algas no se rompen por esta tecnología, sino que se dañan solamente las internas, de modo que no se liberan inmediatamente las toxinas. De acuerdo a Kurokawa et al. (2016), la ruptura de las células depende de la frecuencia; la cavitación, más que los efectos directos del ultrasonido, es responsable de la ruptura de las algas, incluso en mayor medida que los efectos químicos causados por el ultrasonido. Kurokawa et al. postulan como posibilidad que influya el tamaño de la burbuja oscilante causada por la cavitación, pero también proponen que la ruptura se deba al efecto de la resonancia mecánica de las células algales. Rajasekhar et al. (2012) revisaron los efectos del ultrasonido en las cianobacterias y lo describieron como un proceso que consiste en la ruptura de las vacuolas de gas que les proveen flotación y que logran ubicarlas de tal forma que reciban la luz solar, lo cual regula su crecimiento.

Como mencionan Dunn y Pond (1978), ya en 1944 Lehmann describió el efecto del ultrasonido en la permeabilidad de las células, y en 1971 el mismo autor estudió la cinética de colapsado de estas vacuolas por ultrasonido, lo cual inspiró la tecnología. Por ejemplo, exponiéndolas a 120 W de potencia y 28 kHz durante 3 segundos, el 80% de una suspensión de algas sedimentaba después de 30 segundos. En estudios experimentales la microscopía de transmisión mostraba que las vacuolas se recuperaban y quedaban intactas tal como antes de haber sido colapsadas.

Yamamoto et al. (2015) demostraron que la eficiencia del ultrasonido en suspensiones dependía tanto de la frecuencia como de la potencia acústica, trabajando entre 20 y 1146 kHz y distintas potencias, pero las mismas dependían de las propiedades mecánicas de las células de cada especie. Esto también ocurría a menores frecuencias e intensidades, según otros autores (1.7 MHz; 0.6 W/cm<sup>2</sup>). En estas condiciones, hay cambios de conductividad eléctrica como indicador in-

directo de la cavitación en suspensiones de algas, ya que se experimenta un aumento brusco de la conductividad de *M. aeruginosa*, lo cual sustenta la teoría de la resonancia de las vacuolas. Las fuerzas aplicadas a través de las ondas sonoras inducen vibraciones en las burbujas, las cuales pueden resonar a una frecuencia característica y determinada por las dimensiones de la vesícula y las propiedades del medio.

A diferencia de otras bacterias, las cianobacterias poseen clorofila, la cual absorbe luz tanto a 430-440 nm como a 660-681 nm, y otros pigmentos, tales como ficobilisomas que absorben a 470-650 nm, lo cual los hace organismos fotosintéticos. Es por eso que se usa el monitoreo de los cambios de clorofila para medir la actividad fotosintética. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con las plantas y las algas verdes, en las cuales hay una antena PSII y un complejo cosechador de luz hidrofóbico dentro de la membrana, ésta está ausente en cianobacterias y es reemplazada por un complejo extracelular soluble, el ficobilisoma compuesto por ficobiliproteínas. La foto-protección ante la sobre-excitación de los centros fotoquímicos en este caso puede obtenerse por disipación de la energía de excitación inducida por la proteína naranja carotenoide a nivel del ficobilisoma, que oficia así de "antena de las cianobacterias" (Kirilovsky y Kerfeld, 2012). Por otra parte, a diferencia de las algas verdes, las cianobacterias poseen ficocianina, la cual sufre mayores daños que la clorofila, afectándolas más que a las algas verdes.

Otras teorías apuntan también que la destrucción de las células de cianobacterias se produce por daños ocasionados por radicales libres por peroxidación de los lípidos, pero la causa principal es la pérdida de flotación. También hay efectos en la división celular y la morfología. *M. aeruginosa* es más sensible a la sonicación en el ciclo tardío de luz, o antes del atardecer y en la fase exponencial de crecimiento. Las algas filamentosas *Anabaena circinalis* y *Aphanizomenon* son aún más inhibidas que las unicelulares, pero por disrupción de la estructura filamentosas. La frecuencia está en un rango de 20 kHz a 1,7 MHz. Para seleccionar los parámetros hay que considerar frecuencias y potencias, el tiempo de exposición y el uso del agua y la especie que se quiere eliminar. Estos mismos autores ofrecen una tabla con las distintas combinaciones de estos parámetros y una revisión de métodos alternativos de control de cianobacterias en combinación con ultrasonido.

## Equipos comercialmente disponibles y aplicabilidad a ríos, lagunas, tajamares y estanques

La tecnología está madura para la aplicación en embalses, lagunas y estanques. Según los fabricantes, el tratamiento es amigable para el medio ambiente y eficiente en cuanto a costos. Una boya auto-energizada se localiza en puntos seleccionados del lago. Su sistema acústico se programa en forma remota y genera frecuencias que resuenan a las células de las cianobacterias y las rompen (<http://www.clearwater-pmpc.com/>). Como resultado de este proyecto se logró desarrollar el sistema de control de algas que usa ultrasonido, pero más bajo en costos de operación e instalación que otros, ya que el sistema es autónomo porque monitorea e interpreta los parámetros de calidad de agua.

El equipo diseñado por la empresa LG Sonic emite señales de ultrasonido basadas en el tipo de algas presentes y no afectaría a plantas, insectos u otras formas de vida presentes

en el cuerpo de agua. Los paneles solares y baterías les proporcionan energía para operación continua y sus sensores están conectados a brazos sumergibles. Uno de sus modelos permite tratar superficies de agua con una cobertura de hasta 500 m en diámetro y en dos o tres semanas se trataría un tajamar mediano, pero eso se debe determinar experimentalmente en cada caso. Este dispositivo no solo afecta la flotación y fotosíntesis, sino que también impide la adherencia de las bacterias a las superficies, debilitando las bio-películas o biofilms, previniendo su formación (<http://www.lgsonic.com/how-does-lg-sonic-work/>). Se lo suele usar para acuacultivo, campos de golf y tajamares de riego. Para su aplicación en ríos se encuentra todavía en escala experimental. Otras marcas comerciales provienen de India (<http://m.indiamart.com/tanclean-india/aboutus.html>), Reino Unido, Nueva Zelanda, Australia (<http://www.envirosonic-algaecontrol.com/>), Japón (Honda Electronics Co. Ltd., Toyohashi, Japón).

### Otros usos del sistema de ultrasonido en el campo ambiental

El ultrasonido de alta frecuencia se ha utilizado exitosamente para optimizar los tratamientos para aguas residuales de alta carga orgánica (Zinadini, et al., 2015). A frecuencias de 1-3 MHz el ultrasonido se puede emplear para cosechar microalgas, en tanto si es de alta intensidad (20-50 kHz) activa las catálisis heterogéneas y enzimáticas de reacción con la biomasa, ayudando a obtener mayores rendimientos y reducir el tiempo de extracción en la producción de biocombustibles (Luo, et al., 2014). Este mismo autor recomienda que se seleccionen cuidadosamente los parámetros operacionales para aplicar correctamente esta tecnología para estos fines. En tanto, el ultrasonido pulsado se ha usado para bajar la carga microbiana de aguas naturales (Al-Juboori, et al., 2015).

### Probabilidad de impactos negativos

El uso de ultrasonido en actividades diagnósticas clínicas es común desde hace varias décadas. O'Brien (1978) discute los efectos en tejidos biológicos de distintos tipos de ultrasonido y concluye que la evaluación de riesgos de la seguridad del ultrasonido para el ser humano es una cuestión de umbrales.

La selectividad del método en cianobacterias fue demostrada por Rajasekhar et al. (2012), comparando *M. aeruginosa* y otras algas verdes tales como *Chlorella spp.*, siendo estas últimas poco afectadas por el ultrasonido. Esto es positivo, ya que son sustento de peces y otros organismos acuáticos. Como también ataca algas filamentosas y diatomeas, que forman obstrucciones de filtros en plantas de tratamiento, y las de *Anabaena spp.*, que causan olores y sabores, también sería positivo en este sentido. Esta menor diversidad no afectaría negativamente el ambiente porque se garantiza la producción primaria del ecosistema al existir algas verdes. Todos los otros organismos acuáticos no serían afectados por el ultrasonido. Según estos investigadores, la aplicación de ultrasonido no resulta ser nociva para el resto de la vida acuática ni destruye los organelos celulares de plantas más complejas. Las toxinas son liberadas por las cianobacterias al descomponerse, pero dejan de producirse al ir muriendo las células y como la reproducción de las algas disminuye, también lo hacen las toxinas liberadas. Las bacterias que descomponen nutrientes pueden entonces actuar.

En cuanto a los efectos en crustáceos, en estudios de laboratorio se han evidenciado efectos, según Lürling y Tolman (2014). A altas frecuencias, Holm et al. (2008) lo han usado para control de especies nocivas para aguas de proceso. De modo que para no agredir a las especies acuáticas en cursos de agua las intensidades y frecuencias deberán ser controladas cuidadosamente.

### Antecedentes de uso en el mundo: estudios de caso de aplicación piloto o a gran escala

Un ejemplo de proyecto internacional de la aplicación de ultrasonido de bajas amplitudes colocado en columnas sumergidas que tienen mezcladores que llevan el agua a pasar por el tratamiento y se usan para control de floraciones algales es el de la Universidad de Adelaida, Australia, en colaboración con empresas que están investigando la eficiencia de esta tecnología (University of Adelaide, 2010). En Europa, el desarrollo del equipo LG Sonic para uso en lagos fue financiado a través del Programa Marco FP7-SME, bajo el nombre de proyecto de referencia 286875, titulado CLEARWATERPMPC ("Development of an efficient environmentally-friendly Algae Control System, based on ultrasound technology, designed for use in bigger ponds and lakes") desde 1/1/2012 con una duración de dos años (CORDIS, s.d.).

En su reseña Wu et al. (2011) discuten la aplicación a estudios piloto y en grandes lagos, tales como el Lago Senba, de Japón, con un volumen de 365000 m<sup>3</sup> y profundidad media de 1 m, en el que se emplearon 10 sistemas flotantes ultrasónicos y que operó satisfactoriamente a 200 kHz de frecuencia (intensidad 0.1 W/cm<sup>3</sup>). En este estudio el ultrasonido disminuyó la concentración de clorofila-a en el verano. Este proceso se ha combinado también con bombas de agua en pequeños estanques, para luego expandir el agua sonificada hacia la superficie de un tanque de 9000 m<sup>3</sup>. En China, la Universidad del Sureste empleó un enfoque diferente para disminuir las células. En un cerramiento de 400 m<sup>2</sup> del Lago Taihu, usaron un bote con equipo ultrasónico (20 sondas) y transductores de a bordo.

En proyectos realizados en Estados Unidos por Kaser y Perdue (2015) en el Lago Rockwell para controlar las algas antes de entrar en la planta de tratamiento de agua se usó el sistema compuesto por equipo de ultrasonido con sensores de parámetros de calidad de agua colocados en boya con sondas de pH, turbiedad, sólidos suspendidos, clorofila-a (algas), ficocianina, oxígeno disuelto y temperatura. Con base en estos parámetros el sistema cambia el patrón de vibración. Cada boya está equipada por paneles solares para autoabastecerse de energía. El batallón de ingenieros de la Armada de Estados Unidos evaluó este método y describe su aplicación a un club campestre de Rockland, Nueva York. Este sistema también fue probado en Canoe Brook, un embalse en Nueva Jersey, y se concluyó que se redujeron los problemas de sabor y olor y de niveles de algas que entraban en la planta potabilizadora, requiriendo menos alúmina para tratarla, dando un resultado económico de 1.8 años de repago. En Corea del Norte se logró reducir los aportes de nutrientes pero, aun así, se evidenciaron eventos de eutrofización en los tramos inferiores del Río Nakdong, por lo cual, para disminuir la cantidad de fósforo en el agua y en forma simultánea en el fondo del río se aplicaron tecnologías para suministrar oxígeno disuelto al sedimento

para remover nutrientes, lo que hizo menos económico el procedimiento (Tekile, et al., 2015).

## Resultados

### Avances del plan de proyecto de demostración de la tecnología de ultrasonido en el marco del Programa Aguas LATU/Latitud

Dado que el método de ultrasonido es considerado como promisorio pero aún requiere investigación para evaluar su efectividad e inocuidad, actualmente estamos demostrando esta tecnología en un proyecto colaborativo en el Centro Regional Sur de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República que tiene 230 vacas en un tambo experimental. Existe allí un tamar eutrofizado al que expusimos a un tratamiento con un equipo de ultrasonido LG-Sonic E line, observando que la concentración de clorofila-a descendió de 766 a 159 µg/L en el plazo entre 25/6/2015 a 2/7/2015, pero se requieren mayores trabajos de validación para conseguir resultados estadísticamente significativos y para contrarrestar los efectos de las condiciones ambientales variables. Para ello, continuamos evaluando tanto las comunidades de peces, de bentos y de zoo y fitoplancton, como la calidad del agua, utilizando métodos físicos y químicos. Los estudios de ecotoxicidad dispuestos abarcan desde efectos agudos, crónicos, mutagénicos y de neurodegeneración, a la aplicación de técnicas de biología molecular y metagenómica. En pasos subsiguientes se realizarán estudios de los efectos en el ecosistema, realizando cerramientos en el tamar en la zona de influencia del equipo para tener más acotado el sistema.

## Conclusiones

Las metodologías existentes para control de floraciones de algas y cianobacterias nocivas son variadas, pero hasta el momento no existe ninguna totalmente satisfactoria. Es por ello que es necesario continuar investigando y sopesando los beneficios y los riesgos de cada una, tanto económicos, como ambientales. En el caso del sistema por irradiación de ultrasonido la extensión cada vez mayor de esta tecnología a nivel mundial la hace particularmente atractiva, pero la gestión de las floraciones tiene que involucrar un control muy estrecho de los equipos y de los otros usos del agua además de los requeridos para potabilización, tales como los recreativos. Sin perjuicio de estas soluciones de remediación, la prevención por disminución de los aportes de nutrientes y la educación ambiental siguen siendo clave para realizar una buena gestión de los recursos hídricos y evitar tener que recurrir a medidas paliativas o de mitigación de los daños realizados sobre los ecosistemas acuáticos.

## Reconocimientos

Las investigaciones se vienen realizando actualmente en forma de proyectos colaborativos en el marco del Programa Aguas LATU y Latitud con una red nacional e internacional. En el proyecto de restauración de lagunas trabajamos en estrecha

colaboración con la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República (UdelaR). También colaboraron el Instituto Pasteur y en algunas etapas la Dirección Nacional de Medio Ambiente. En las fases de demostración de la eficiencia e inocuidad de otros procedimientos de restauración de lagos se realizarán proyectos de investigación académica aplicada con la Facultad de Ciencias de UdelaR y la Universidad Wageningen, de Holanda. En las fases de tratamientos de efluentes de los tambos para control de las descargas puntuales participan UNESCO-IHE, Delft, Holanda y Univalle, Colombia. Los efectos tóxicos neurodegenerativos y otros están siendo evaluados junto con el Instituto Pasteur de Montevideo, o sea, el Instituto Clemente Estable, la Universidad ORT, la Universidad del Trabajo (UTU) y la Universidad Tecnológica (UTEC). La autora agradece el aporte conceptual del Prof. Daniel Dietrich de la Universidad de Konstanz, Alemania en cuanto a aspectos de la toxicidad neurodegenerativa de las cianotoxinas.

## Referencias

- Azevedo, S., Carmichael, W., Jochimsen, E., Rinehart, K., Lau, S., Shaw, G. y Eaglesham, G., 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. En: *Toxicology*, 181-182, pp.441-446.
- Al-Juboori, R. A., Aravinthan, V., y Yusaf, T., 2015. Impact of pulsed ultrasound on bacteria reduction of natural waters. En: *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, pp.137-147.
- Banack, S. A., Murch, S. J. y Cox, P. A., 2006. Neurotoxic flying foxes as dietary items for the Chamorro people, Marianas Islands. En: *Journal of Ethnopharmacology*, 106, pp.97-104
- Chorus, I., Bartram, J., ed., 1999. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: E&FN Spon.
- CORDIS, s.d. *Final report summary - CLEARWATERPMPC (Development of an efficient environmentally-friendly Algae Control System, based on ultrasound technology, designed for use in bigger ponds and lakes)* [En línea]. [s.l.]: CORDIS.[Consulta: noviembre de 2016]. Disponible en: [http://cordis.europa.eu/result/rcn/156461\\_en.html](http://cordis.europa.eu/result/rcn/156461_en.html)
- Dehghani, M. H., 2016. Removal of cyanobacterial and algal cells from water by ultrasonic waves — A review. En: *Journal of Molecular Liquids*, 222, pp.1109-1114.
- Dunn, F. y Pond, J.B., 1978. Selected non-thermal mechanisms of interaction of ultrasound and biological media. Chap. IX. En: Fry, Francis J., ed., 1978. *Ultrasound: its application in medicine and biology*. New York: Elsevier.
- Gerling, A. B., Browne, R.G., Gantzer, P.A., Mobley, M.H., Little, J.C. y Carey, C.C., 2014. First report of the successful operation of a side stream supersaturation hypolimnetic oxygenation system in a eutrophic, shallow reservoir. En: *Water Resources*, 67, pp.129-143
- Giannuzzi, L., Sedan, D., Echenique, R. y Andrinolo, D., 2011. An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina. En: *Marine Drugs*, 9(11), pp. 2164-2175.
- He, X., Liu, Y.-L., Conklin, A., Westrick, J., Weavers, L. K., Dionysiou, D. D., Lenhart, J.J., Mouser, P.J., Szlag, D. y Walker, H.W., 2016. Toxic cyanobacteria and drinking water: Impacts, detection, and treatment. En: *Harmful Algae*, 54, pp.174-193.
- Holm, E.R., Stamper, D.M., Brizzolara, R.A., Barnes, L., Deamer, N. y Burkholder, J.M., 2008. Sonication of

- bacteria, phytoplankton and zooplankton: Application to treatment of ballast water. En: *Marine Pollution Bulletin*, 56, pp.1201–1208.
- International Centre for Research on Cancer, [s.d]. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. List of classifications* [En línea]. Lyon: IARC. [Consulta: 18 de noviembre de 2016]. Disponible en: [http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest\\_classif.php](http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php).
- Kaser, M. y Perdue, A., 2015. Utilizing ultrasonic technology to manage algal blooms in Lake Rockwell. En: *Honors Research Projects*, Paper 68.
- Kruk, C., Piccini, C., Segura, A., Nogueira, L., Carballo, C., Martínez De La Escalera Siri, G., Calliari, D., Ferrari, G., Simoens, M., Cea, J., Alcántara, I., Vico, P. y Míguez, D., 2015. Herramientas para el monitoreo y sistema de alerta de floraciones de cianobacterias nocivas: Río Uruguay y Río de la Plata. En: *INNOTEC*, 10, pp. 23-39.
- Kundu, S., Coumar, M., Rajendiran, S. y Ajay, Rao, A., 2015. Phosphates from detergents and eutrophication of surface water ecosystem in India. En: *Current Science*, 108(7), pp.1320-1325.
- López, C.B., Jewett, E.B., Dortch, Q., Walton, B.T. y Hudnell, H.K., 2008. *Scientific assessment of freshwater harmful algal blooms*. Washington: Interagency Working Group on Harmful Algal Blooms, Hypoxia, and Human Health of the Joint Subcommittee on Ocean Science and Technology.
- Assessment of Freshwater Harmful Algal Blooms. En: *Interagency Working Group on Harmful Algal Blooms, Hypoxia, and Human Health of the Joint Subcommittee on Ocean Science and Technology*. Washington, DC.
- Luo, J., Fang, Z. y Smith, R. L., 2014. Ultrasound-enhanced conversion of biomass to biofuels. En: *Progress in Energy and Combustion Science*, 41, pp.56–93.
- Lürling, M. y Tolman, Y., 2014. Beating the blues: Is there any music in fighting cyanobacteria with ultrasound? En: *Water Resources*, 66, pp. 361–373.
- Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E. y Thomas, O., 2013. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. En: *Environment International*, 59, pp.303–327.
- American National Standards Institute, 1988. *NSF/ANSI 61: Drinking water system components*. Michigan: NSF.
- O'Brien Jr, W.D., 1978. Safety of ultrasound. En: deVlieger, M., et al., eds. *Clinical handbook of ultrasound*. New York: Wiley.
- OMS, 2011. *Guías para la calidad del agua potable* [En línea]. 3ª ed. Ginebra: OMS. [Consulta: 18 de noviembre de 2016]. Disponible en: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3rev/es/](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/es/)
- OMS, 2015. *Water-related diseases. Cyanotoxins* [En línea]. Ginebra: OMS. [Consulta: 11 de junio de 2015]. Disponible en: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/diseases/cyanobacteria/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/cyanobacteria/en/)
- Pablo, J., Banack, S., Cox, P., Johnson, T., Papapetropoulos, S., Bradley, W., Buck, A. y Mash, D., 2009. Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease'. En: *Acta Neurologica Scandinavica*, 120(4), pp. 216-225.
- Paerl, H. W., Gardner, W. S., Havens, K. E., Joyner, A. R., McCarthy, M. J., Newell, S. E., Qing, B. y Scott, J.T., 2016. Mitigating cyanobacterial harmful algal blooms in aquatic ecosystems impacted by climate change and anthropogenic nutrients. En: *Harmful Algae*, 54, pp. 213–222.
- Rajasekhar, P., Fan, L., Nguyen, T. y Roddick, F.A., 2012. A review of the use of sonication to control cyanobacterial blooms. En: *Water Research*, 46(14), pp.4319–4329.
- Schmidt, J. R., Wilhelm, S. W. y Boyer, G. L., 2014. The fate of microcystins in the environment and challenges for monitoring. En: *Toxins*, 6(12), pp.3354–3387. <http://doi.org/10.3390/toxins6123354>
- Søndergaard, M., Liboriussen, L., Pedersen, A.R. y Jeppesen, E., 2008. Lake restoration by fish removal: short-and long-term effects in 36 danish lakes. En: *Ecosystems*, 11, pp.1291-1305.
- Szlag, D. C., Sinclair, J. L., Southwell, B. y Westrick, J. A., 2015. Cyanobacteria and cyanotoxins occurrence and removal from five high-risk conventional treatment drinking water plants. En: *Toxins*, 7(6), pp.2198–2220. <http://doi.org/10.3390/toxins7062198>.
- Tekile, A., Kim, I. y Kim, J., 2015. Mini-review on river eutrophication and bottom improvement techniques, with special emphasis on the Nakdong River. En: *Journal of Environmental Sciences*, 30, pp.113-121.
- University of Adelaide, 2010. *Using ultrasound to control toxic algal blooms* [En línea]. Adelaide: University of Adelaide. [Consulta: noviembre de 2016]. Disponible en: <https://www.adelaide.edu.au/news/news40181.html>
- USEPA, 2015. *Cyanobacteria/cyanotoxins. Nutrient policy and data* [En línea]. Boston: USEPA. [Consulta: 11 de noviembre de 2016]. Disponible en: <http://www2.epa.gov/nutrient-policy-data/cyanobacteriacyanotoxins>.
- Virkutyte, J., 2015. 36 – The use of power ultrasound in biofuel production, bioremediation, and other applications. En: *Power Ultrasonics*, pp.1095–1122.
- Wells, M. L., Trainer, V. L., Smayda, T. J., Karlson, B. S. O., Trick, C. G., Kudela, R. M. y Cochlan, W. P., 2015. Harmful algal blooms and climate change: Learning from the past and present to forecast the future. En: *Harmful Algae*, 49, pp.68–93.
- Wu, X., Joyce, E.M. y Mason, T.J., 2011. The effects of ultrasound on cyanobacteria. En: *Harmful algae*, 10, pp.738-743.
- Zinadini, S., Rahimi, M., Zinatizadeh, A. A. y Shaykhi Mehrabadi, Z., 2015. High frequency ultrasound-induced sequence batch reactor as a practical solution for high rate wastewater treatment. En: *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(1), pp.217–226.





# ÍNDICE DE AUTORES

---

Acosta, Silvina . . . . .	34
Acuña, Ana . . . . .	34
Aldrovandi, Ariel . . . . .	15
Cal, Karina . . . . .	15
Carro, Silvana . . . . .	15
Cerdeiras, María Pía . . . . .	27
Cesio, María Verónica . . . . .	27
Espínola Moltedo, Julio César . . . . .	48
Giacaman, Sheila. . . . .	15
González Revello, Álvaro . . . . .	15
Heinzen, Horacio. . . . .	27
Lena, Anaydé . . . . .	34
Martínez, Wilner . . . . .	34
Míguez, Diana . . . . .	34, 54
Niell, Silvina . . . . .	27
Piagentini, Andrea Marcela . . . . .	7
Rey, Fabiana. . . . .	34
Rivero Machado, Anisleidy. . . . .	27
Rodríguez Arzuaga, Mariana . . . . .	7
Salsi, María Sara . . . . .	7
Soubes, Matilde . . . . .	27
Spósito, Martín . . . . .	48
Tort, Cecilia . . . . .	34
Ureta, Alejandro . . . . .	34

# ÍNDICE TEMÁTICO

---

## A

Ácido 5-fosfochiquímico . . . . . 49  
Ácido ascórbico . . . . . 8-9, 11, 13  
Ácido cítrico. . . . . 8  
Ácido corísmico . . . . . 49  
Ácido fosfoenolpirúvico . . . . . 49  
Actividad antimicrobiana . . . . . 15-17, 20, 22-23  
Acumulación . . . . . 28, 31  
Adn . . . . . 36-40  
Agricultura intensiva . . . . . 56  
Agroquímicos. . . . . 27-28  
Agua . . . . . 8-9, 11, 34-35, 37, 39-42, 49-52, 54-61  
Agua potable . . . . . 34-35, 41-42, 54-56, 58, 61  
Aguas residuales . . . . . 41, 55, 59  
Aguas superficiales . . . . . 40, 48-49, 51-52, 55, 58  
Aireación. . . . . 18, 57  
Algas nocivas . . . . . 54  
Algas verde-azules. . . . . 55  
Alzheimer . . . . . 56, 61  
Ambiente . . . . . 8-9, 27-28, 34-35, 49, 51, 57-60  
Aminoácidos . . . . . 22, 49, 55  
Anfibios . . . . . 35  
Antioxidantes . . . . . 8, 14, 56  
Aves. . . . . 35, 49

## B

Basidiomicetes . . . . . 27-32  
Bacterias . . . . . 15-17, 22, 49, 57-59  
Bacterias ácido lácticas. . . . . 15  
Bacteriocinas . . . . . 15-16, 22-25  
Bacterioplancton. . . . . 64  
B. Adusta. . . . . 30-32  
Bioacumulación . . . . . 28  
Biodegradación . . . . . 31, 57-58  
Biomaniplulación. . . . . 57  
Biorremediación . . . . . 27-28, 32  
Bjerkandera adusta . . . . . 27-32

## C

Cáncer . . . . . 49, 56  
Carbono activado . . . . . 56  
Cianobacterias . . . . . 54-61  
Cianotoxinas . . . . . 55-57, 60  
Cloración. . . . . 57  
Clorados . . . . . 27-28, 32  
Coagulantes. . . . . 57  
Color . . . . . 7-8, 10-11, 13  
Compuestos recalcitrantes . . . . . 28, 32  
Contaminantes . . . . . 27-28, 32

Cryptosporidium sp. . . . . 34-43, 47  
Cryptosporidium sp. . . . . 34, 42  
Cuantificación . . . . . 18-19, 21, 37, 39-40, 43  
Cuartirolo . . . . . 15-18, 21-24-65  
Cultivos. . . . . 15-16, 18, 27, 29, 48-49, 51-52

## D

Daphnia magna . . . . . 48, 50, 52  
Ddt . . . . . 27  
Decoloración . . . . . 29-32  
Dermatotoxinas . . . . . 55  
Descontaminación biológica . . . . . 28  
Desecación . . . . . 57  
Difusión enzimática. . . . . 31

## E

Ecosistemas . . . . . 49, 51, 54-56, 60  
Endosulfán . . . . . 27-32  
Enzimas . . . . . 10, 16, 20, 22, 28-32, 58  
Epsps . . . . . 48  
Esclerosis lateral . . . . . 56  
Eutrofización . . . . . 54-56, 59

## F

Ffenilalanina . . . . . 49  
Fermentación . . . . . 18, 20, 23, 57  
Firmeza. . . . . 8, 10, 12-13  
Fitoplancton . . . . . 60  
Floculantes . . . . . 57  
Floraciones . . . . . 54-57, 59-61  
Fósforo . . . . . 54, 56-57, 59  
Frutas. . . . . 7-8

## G

Glifosato de amonio. . . . . 48-49  
Glucosa. . . . . 10, 28-32

## H

Herbicidas . . . . . 28, 48-49, 51  
Hongos. . . . . 23, 27-30, 32-33, 49  
Hortalizas . . . . . 7-8  
Humedales flotantes . . . . . 57  
Hydra attenuata . . . . . 48, 50, 53

## I

Impacto ambiental . . . . . 49  
Inhibición . . . . . 13, 17-23, 48, 50, 52  
Intoxicación . . . . . 55-56  
Irradiación . . . . . 54, 57-58, 60

<b>L</b>		
Lactococcus lactis . . . . .	15-17, 19-26	
Lactuca sativa. . . . .	48-50	
Leche . . . . .	15-26	
Lignina . . . . .	28, 32	
Listeria innocua . . . . .	15, 17-21, 23-24	
Listeria monocytogenes . . . . .	15-20, 23-26	
<b>M</b>		
Malta . . . . .	28-31	
Mamíferos . . . . .	35, 49	
Manipulaciones hidrológicas . . . . .	57	
Manzanas granny smith . . . . .	7-8, 10-13	
Materia fecal . . . . .	36, 39, 42	
Métodos microscópicos . . . . .	65	
Métodos moleculares. . . . .	34-35	
Mezcla mecánica. . . . .	57	
Microcistina . . . . .	55	
Microcystis . . . . .	55-56	
Microorganismos aerobios . . . . .	12-13	
Microtox . . . . .	50	
Mínimo procesamiento. . . . .	7-8, 10-13	
<b>N</b>		
Nanofiltración . . . . .	58	
Neurotoxinas . . . . .	55	
<b>O</b>		
Ooquistes . . . . .	35-41, 43	
Ósmosis inversa . . . . .	57	
Oxidación química. . . . .	57	
Oxígeno . . . . .	16, 54, 57, 59	
Ozonización. . . . .	57	
<b>P</b>		
P. Atropurpurascens. . . . .	28, 30-31	
Parásitos . . . . .	34-35, 57	
Parasitosis . . . . .	34-35, 38, 40-43	
Pardeamiento enzimático . . . . .	8, 10, 12-13	
Pcr . . . . .	35-41, 43, 47	
Peces . . . . .	35, 54-55, 57, 59-60	
Pesticidas . . . . .	27-29, 49, 52	
Ph . . . . .	8-10, 12-13, 16, 18-23, 28-29, 36, 59	
Plancton . . . . .	57	
Plantas . . . . .	49, 56-59	
Polifenoles. . . . .	7-9, 11-13	
Potabilización. . . . .	56-57, 60	
Productos frescos . . . . .	7	
Protozoarios. . . . .	34-35	
Pseudokirchneriella subcapitata . . . . .	48, 50	
Punctularia atropurpurascens . . . . .	28, 30-31	
<b>Q</b>		
Queso. . . . .	16-19, 21, 23-24	
Queso tipo cuartirolo . . . . .	17-18, 21, 23	
<b>R</b>		
Reptiles. . . . .	35	
Riesgo sanitario . . . . .	35	
<b>S</b>		
Sal . . . . .	24, 48-51	
Sedimentos . . . . .	54	
Sensoriales . . . . .	7-8, 12-16, 19-21, 24	
Soja . . . . .	27, 49	
Sólidos solubles . . . . .	7-8, 10, 13	
Streptococcus thermophilus . . . . .	16-17, 25	
Suelos. . . . .	33, 41-42, 49, 52	
<b>T</b>		
Textura . . . . .	8, 19, 24	
Tipificación . . . . .	35	
Tirosina. . . . .	49	
Toxicidad. . . . .	49-52, 55-56, 60	
Toxinas . . . . .	54-59	
Triptofano . . . . .	49	
Tryglif. . . . .	48-51	
<b>U</b>		
Ultrafiltración. . . . .	58	
Ultrasonido . . . . .	8-9, 54-55, 57-60	
<b>V</b>		
Vibrio fischeri . . . . .	48, 50	
Vida útil . . . . .	7-8, 16	
Vitamina c . . . . .	7, 9, 11, 13	
<b>X</b>		
Xenobióticos . . . . .	27-28, 31-32	
<b>Y</b>		
Yerba mate . . . . .	7-8, 11, 13-14	
Ynb . . . . .	28-32	
Yogur . . . . .	15	
<b>Z</b>		
Zoobentos. . . . .	49	
Zooplancton . . . . .	57	

# **INNOTEC**

REVISTA DEL LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY