

ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES FÍSICOQUÍMICAS Y ECOLÓGICAS EN LOS MECANISMOS DE ANTAGONISMO ENTRE HONGOS OCRATOXIGÉNICOS PRESENTES EN CEREZAS DE CAFÉ Y BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Josue Uriel Amador Hernández^a, Roberto Lazzarini Lechuga^b, Angélica Román Guerrero^a, Isabelle Gaimé-Perraud^c, Gabriela M. Rodríguez Serrano^a, Gerardo Saucedo Castañeda^a

^a Depto. de Biotecnología, ^b Depto. Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, ^c Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Francia
ibqi.uriel@live.com.mx, saucedo@xanum.uam.mx

Resumen

El objetivo de este trabajo es limitar el desarrollo del hongo *Aspergillus carbonarius* y la producción de ocratoxina A en frutos de café, con la aplicación de bacterias lácticas del género *Lactobacillus*. Para este propósito, se estudian los mecanismos involucrados en el antagonismo entre ambos microorganismos. Primero se determinó que tipo de interacción presentan ambos microorganismos al estar en un mismo hábitat, utilizando microscopía de campo claro se encontró que la interacción predominante es la adhesión bacteriana sobre la superficie de la espora fúngica, este fenómeno inhibe la germinación de la espora fúngica. Por otra parte, se estudió el potencial Z de ambos microorganismos para determinar si la adhesión se da por un fenómeno electroquímico, el resultado fue que ambos microorganismos tienen cargas negativas de (-2 a -20 mV) en pH de 2 a 7, por lo que la adhesión no se explica por un fenómeno electroquímico. Considerando una teoría fisicoquímica se evaluó el efecto de $AlCl_3$ 0.007M para alterar la fuerza iónica del medio y así modificar la carga superficial de los microorganismos a valores positivos. El resultado fue que al agregar $AlCl_3$ la carga de la bacteria y el hongo se vuelven positivas con magnitudes de 22 y 16.4 mV, respectivamente. Por lo que será posible favorecer una atracción electroquímica entre ambos microorganismos para fomentar el biocontrol del hongo micotoxigenico. Otro mecanismo de adhesión es por adhesinas que será analizado con microscopía confocal, pero como primer paso se comprobó que los blancos (medios de cultivo y microorganismos) no autoflorescen.

Introducción

Panorama mundial. Entre los ciclos cafetaleros 2005/06 y 2015/16, la producción mundial de café creció a una tasa promedio anual de 2.7 por ciento. En el ciclo 2015/16 la cosecha global ascendió a 153.3 millones de sacos de 60 kg, es decir, el mismo nivel de producción del ciclo previo. Por tipo de café, el comportamiento de la cosecha fue diferenciado: la producción de café arábica disminuyó 0.4 por ciento, mientras que la de café robusta se incrementó en 0.6 por ciento a tasa anual.

El 72.1 % de la producción mundial de café en 2015/16 se concentró en cinco países: Brasil (32.2 %), Vietnam (19.1 %), Colombia (8.9 %), Indonesia (7.7 %) y Etiopía (4.2 %). Entre los principales productores también están Honduras (3.7 %), India (3.5 %) y Perú (2.3 %). México se ubicó en la décimo primera posición, con una participación del 1.6 % de la producción mundial según datos del Panorama Agroalimentario de Café (BM FIRA 2016/2017).

Panorama nacional. En el ciclo cafetalero 2015/16 se cosecharon 664,963 hectáreas de café, de la cual el 89.7 % se concentró en cinco entidades: Chiapas (36.0 %), Veracruz (19.7 %), Oaxaca (17.8 %), Puebla (9.3 %) y Guerrero (6.8 %) (SIAP 2016).

El fruto y su contaminación. La ocratoxina A (OTA) es una sustancia natural muy tóxica asociada a diversos trastornos de tipo neurotóxico, genotóxico, teratogénico, nefrotóxico, entre otras [1], por lo que, es considerado un problema de salud pública.

La ocratoxina A, es producida por un moho que se puede encontrar en el café crudo o "verde", y que no se elimina por completo con el tostado o torrefacción. Además el problema se agrava en el procesamiento por vía seca [2].

Datos sobre la OTA. La ocratoxina A es producida por especies de dos géneros de hongos: los *Aspergillus* y los *Penicillium*, que se producen naturalmente en los cereales, las uvas, el café y el cacao. En el café, los hongos más importantes en la producción de OTA son los *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* y algunas cepas de los *A. niger*. La OTA es tan peligrosa que expertos de la FAO y la OMS han establecido un límite máximo tolerable para los humanos de 100 milmillonésimos de gramo por kilogramo de peso corporal a la semana. En 2004, la Unión Europea estableció límites máximos admisibles para la OTA de 5 ppb en el café tostado y molido, y 10 ppb en el café instantáneo. No se han anunciado límites para el café verde (Reglamento de la Comisión Europea, 1881/2006).

Actualmente más de 80 países cultivan el café en sus diferentes tipos, de los cuales poco más de 50 países lo exportan, esto se traduce en que el café es uno de los principales productos aportadores de divisas (8.6 billones de pesos en 2012) a los países relacionados en su cultivo, procesamiento y comercio, además de generar más de 3 millones de empleos, por lo anterior, el café es considerado un producto de gran importancia en el comercio mundial.

Sin embargo la presencia de micotoxinas en cultivos de café conlleva a pérdidas económicas importantes a los países relacionados en su procesamiento y comercialización.

Por lo anterior, se ha propuesto el uso de bacterias del género *Lactobacillus* como microorganismos antagonicos ya que tiene la capacidad de producir biomoléculas como ácidos orgánicos, péptidos, exopolisacáridos capaces de limitar el desarrollo del hongo micotoxigénico [3].

Metodología

Preparación de los cultivos microbianos. Las bacterias ácido lácticas se cultivaron en medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) BD Difco™ durante 24h a 30°C en condiciones aerobias, se realizó una activación y 3 resiembra bajo las condiciones anteriores utilizando 10% v/v de inóculo en cada cultivo.

El cultivo fúngico se realizó en medio PDA (Potato Dextrose Agar) BD Bioxon™ durante 7 días a 30°C en condiciones aerobias. Posteriormente se realizó una re suspensión de esporas en Tween 80 al 0.1% para realizar una resiembra bajo las condiciones anteriormente mencionadas, una vez transcurridos los 7 días de la resiembra, las esporas fueron utilizadas para cada experimento.

Para el estudio de interacción entre ambos microorganismos se utilizaron portaobjetos con dos cavidades, inoculados con una suspensión de esporas de *Aspergillus* (1×10^6 esp/ml) y un 10% v/v de suspensión de bacterias lácticas. Con el fin de documentar la interacción predominante entre ambos microorganismos se utilizó un microscopio óptico Olympus modelo BX40F4, acoplado a una cámara AmScope modelo MU 5000.

Para la evaluación del efecto de AlCl_3 0.007M se eliminaron los medios de cultivo centrifugando las esporas a 10 000 rpm durante 5 min a 4 °C y las bacterias a 6 000 rpm durante 5 min a 4°C retirando el medio por decantación. Posteriormente, se resuspendieron los microorganismos en solución de AlCl_3 0.007M y se llevó a cabo como primera parte la preparación de muestras en portaobjetos con dos

cavidades, inoculados con una suspensión de esporas de *Aspergillus* (1×10^6 esp/ml) y un 10% v/v de suspensión de bacterias lácticas y se adicionó el volumen necesario de AlCl_3 para obtener una concentración final de 0.007M. Las muestras se visualizaron en un microscopio óptico Olympus ya mencionando. Como segunda parte del ensayo, se llevó a cabo la lectura de la carga superficial de ambos microorganismos en presencia de AlCl_3 en el equipo Zetasizer nano series (nano-ZS).

En el caso del estudio de potencial Z, una vez crecidos los microorganismos se procedió a eliminar los medios de cultivo centrifugando las esporas a 10 000 rpm durante 5 min a 4 °C y las bacterias a 6 000 rpm durante 5 min a 4°C retirando el medio por decantación. Posteriormente, se resuspendieron los microorganismos en los buffers a estudiar pH 2-7, seguidamente se llevó a cabo la lectura en el equipo Zetasizer nano series (nano-ZS).

Por último, para la evaluación de autofluorescencia se prepararon medios de cultivo PDA y MRS como lo recomienda el fabricante para posteriormente crecer al hongo y la bacteria respectivamente; bajo las siguientes condiciones, hongo: incubado 30°C durante 14 días, bacteria incubado a 30°C durante 24h en condiciones aerobias. Posteriormente, las muestras fueron visualizadas usando un sistema de microscopia confocal Zeiss LSM780 NLO, una vez evaluados los blancos se procedió a la evaluación de 2 trazadores fluorescentes (DID, DIL) para inducir fluorescencia a la superficie de la espora fúngica y de la bacteria respectivamente, para ello se cultivaron los microorganismos en las condiciones anteriormente mencionadas, posteriormente se prepararon los trazadores fluorescentes como lo recomienda el fabricante Thermo Fisher Scientific-Vybrant Cell-Labeling Solutions. Posteriormente se llevó a cabo las visualizaciones en un sistema de microscopia confocal Zeiss LSM780 NLO.

Resultados

La Figura 1 y 2 muestran micrografías en microscopia de campo claro en un objetivo 40X y 20X donde se observa a las bacterias lácticas y a las esporas respectivamente creciendo en condiciones normales y se estima el incremento de células para las bacterias a través del tiempo, mientras que las esporas muestran el proceso de germinación a través del tiempo. Estas micrografías serán utilizadas como testigos experimentales sin tratamientos.

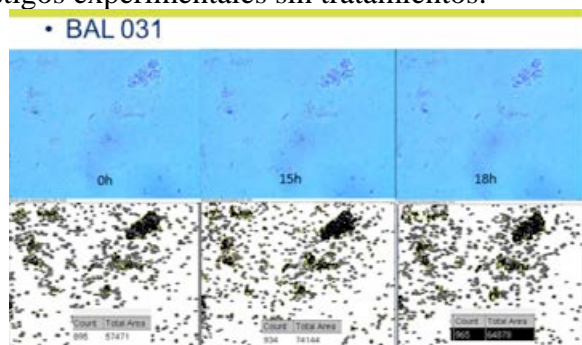


Figura 1. Incremento celular de las bacterias lácticas a través del tiempo (0h,15h,18h)(895, 934, 965 cel) respectivamente. Estimado mediante un programa de procesamiento de imagen digital (Image J)

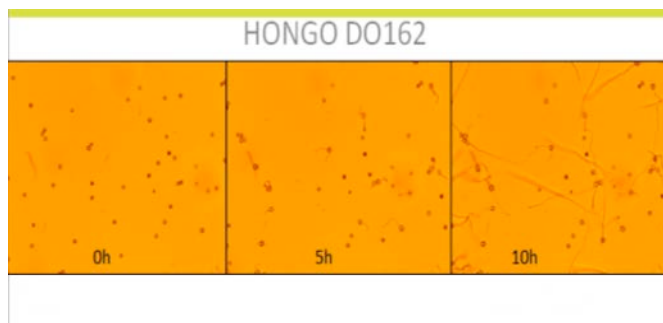


Figura 2. Desarrollo germinativo de las esporas de *Aspergillus* a través del tiempo visualizado en el objetivo 20X. Observándose que a las 5h de incubación las esporas comienzan su proceso de germinación.

La Figura 3 muestra la interacción entre bacterias y esporas fúngicas, observándose que las esporas no germinan en presencia de bacterias. Sin embargo el número de células bacterianas incrementa a través

del tiempo, por lo que posiblemente las bacterias presentan un fenómeno antagónico contra las esporas fúngicas.



Figura 3. Efecto inhibitorio en la germinación de las esporas en presencia de bacterias lácticas, observándose que después de 72h las esporas no presentan germinación mientras que su control sin bacterias presenta germinación después de 5h de incubación.

La Figura 4 muestra la micrografía correspondiente a un video en microscopia en campo claro que muestra que la principal interacción entre bacterias lácticas y esporas fúngicas es la adhesión superficial y es posiblemente un mecanismo responsable del biocontrol de la espora fúngica, por lo que se plantea aumentar la adhesión bacteriana para fomentar el biocontrol.

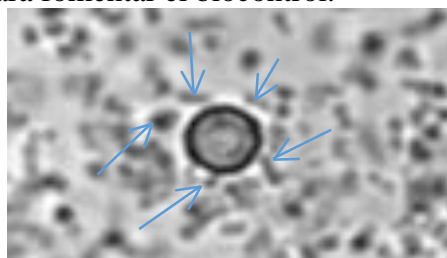


Figura 4. Bacterias adheridas sobre la superficie de la espora fúngica.

La Figura 5 muestra el efecto del tensoactivo iónico AlCl_3 0.007M para aumentar la adhesión bacteriana sobre la superficie de la espora fúngica propuesta en la teoría de coloides “teoría DLVO Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek”, para fomentar la inhibición en la germinación de las esporas fúngicas.

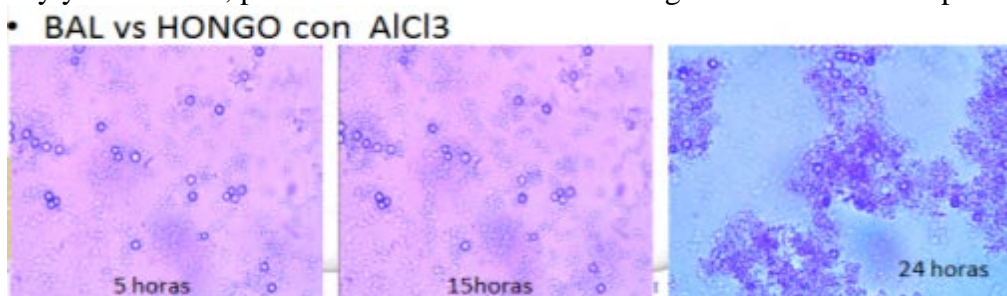


Figura 5. Incremento en la aglomeración celular bacterianas obre la espora fúngica por el efecto de AlCl_3 a través del tiempo.

La Figura 6 muestra los resultados de potencial Z (carga superficial) en unidades de mV, en función del pH. Se observa que al aumentar el pH el valor del potencial negativo aumenta, siendo el mismo comportamiento para ambos microorganismos y que se corresponde por lo reportado por [4,5]. De igual manera se muestra el efecto del electrolito AlCl_3 sobre la carga superficial de los microorganismos, se observa un cambio en la carga superficial de ambos microorganismos pasando de valores negativos a positivos, generando una diferencia de potencial que promovería la atracción electroquímica de superficies.

La Figura 7, muestra las micrografías realizadas con microscopia confocal a 3 diferentes longitudes de onda de excitación y emisión. Se observa que ningún microorganismo presenta auto fluorescencia. Lo cual sugiere que esta técnica será muy útil para evaluar las interacciones bacteria hongo.

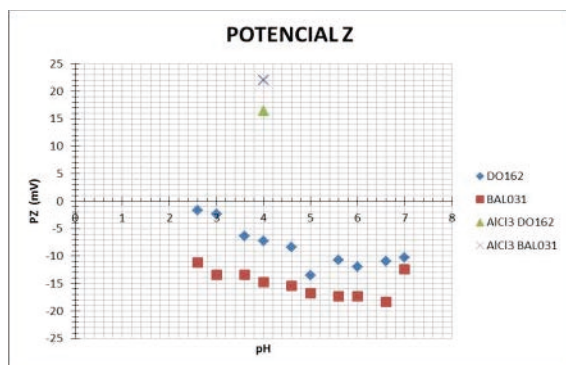


Figura 6. Potencial Z en función del pH y el efecto del AICI3 sobre el potencial Z

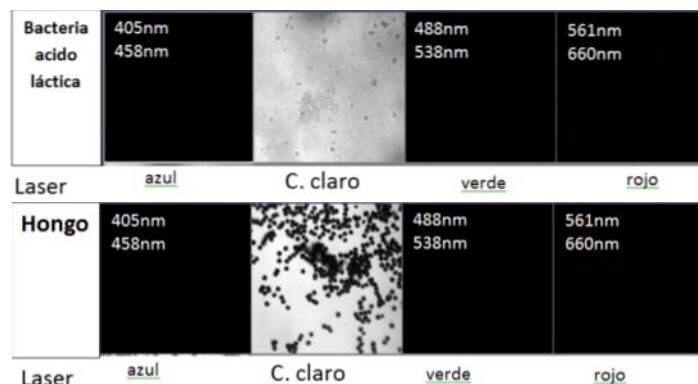


Figura 7. Micrografías de microscopia confocal y campo claro de bacterias lácticas y hongos micotoxigénicos evaluando el efecto de autofluorescencia.

Las Figura 8 y 9 muestran el trazado fluorescente con DIL Y DID de bacterias y esporas fúngicas respectivamente analizados en un sistema de microscopia confocal Zeiss LSM780 NLO; se detectó la presencia de lípidos en regiones particulares de su superficie, lo cual es de suma importancia para un estudio de colocalización que nos ayudaría a determinar si estos lípidos superficiales están relacionados como biomoléculas que ayudan a la adhesión entre ambos microorganismos.

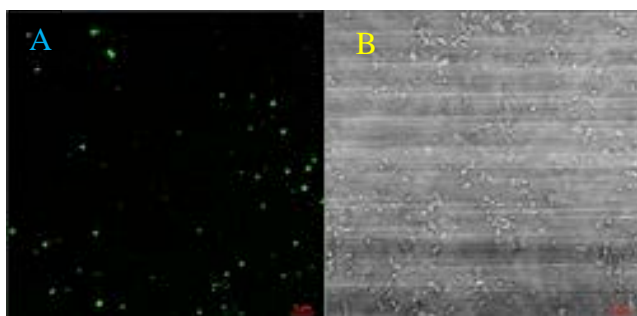


Figura 8. Fluorescencia de las bacterias inducida por el trazador DIL visualizado en Microscopia Confocal (A) y bacterias ácido lácticas en el plano focal en microscopia de campo claro (B)

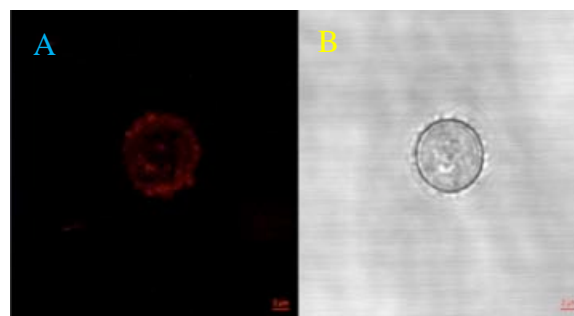


Figura 9. Fluorescencia de la espora fúngica inducida por el trazador DID visualizado en Microscopia Confocal (A) Y espora en el plano focal en microscopia de campo claro (b)

Conclusiones

Se logró determinar un efecto inhibitorio de las bacterias en contra de la germinación de esporas fúngicas, de igual manera se encontró que la principal interacción es la adhesión superficial de las bacterias sobre las esporas fúngicas y ésta adhesión es la posible responsable del biocontrol. Se probó

exitosamente el uso de un electrolito iónico (AlCl_3) para favorecer esta adhesión superficial y como consecuencia fomentar el biocontrol del hongo

Por otra parte en el análisis de carga superficial de los microorganismos se encontró que en condiciones naturales es negativa y esto no explica la adhesión por fenómeno electroquímico. Sin embargo el uso del electrolito AlCl_3 0.007M es efectivo para modificar el potencial Z a valores positivos, alterando la carga superficial de los microorganismos para fomentar una atracción electroquímica.

Por último se determinó que ningún microorganismo y medio de cultivo presentan auto fluorescencia lo que hace ideal para visualizar estructuras muy particulares de cada microorganismo, como adhesinas, marcadas con trazadores fluorescentes usando técnicas inmunoquímicas, es así como mediante el uso de trazadores fluorescentes como DIL Y DID aplicadas en bacterias y esporas fúngicas respectivamente. Se logró visualizar en un sistema de microscopia confocal Zeiss LSM780 NLO las regiones en que las bacterias y esporas poseen lípidos superficiales lo cual es de suma importancia para un estudio de colocalización posterior que nos ayudaría a determinar si estos lípidos superficiales están relacionados como biomoléculas que ayudan a la adhesión entre ambos microorganismos.

Referencias

1. - Irène Ahou Kouadio, Louis Ban Koffi, Jean Gnopo Nemlin, Mireille Bretin Dosso, “Effect of Robusta (*Coffea canephora* P.) coffee cherries quantity put out for sun drying on contamination by fungi and Ochratoxin A (OTA) under tropical humid zone (Côte d’Ivoire)”, *Food and Chemical Toxicology*, 2012.
2. - Hongyin Zhang, Maurice Tibiru Apaliya, Gustav K. Mahunu, Liangliang Chen, Wanhai Li, “Control of ochratoxin A-producing fungi in grape berry by microbial antagonists: A review”, *Trends in Food Science & Technology*, 2016.
3. - Nora Laref, Bettache Guessas and Mebrouk Kihal, “Antifungal Compounds Production in Different Temperatures, pH and on Modified MRS Agar by *Lactobacillus* Strains” *Journal of Biological Sciences*, 13: 94-99. 2013.
4. - Albert t. poortinga, Rolf bos, Henk j. busscher, “Electrostatic interactions in the adhesion of an ion-penetrable and ion-impenetrable bacterial strain to glass”, *colloids and surfaces b: biointerfaces* 20 (2001) 105–117.
5. -Prisca Scha” r-Zammaretti and Job Ubbink, “The Cell Wall of Lactic Acid Bacteria: Surface Constituents and Macromolecular Conformations” *Biophysical Journal Volume 85, 2003* 4076–4092 (Nestle’ Research Center, Lausanne, Switzerland).

AMIDIQ

Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.



UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



XXXIX ENCUENTRO NACIONAL **DE LA AMIDIQ**

"La Ingeniería Química como motor de la innovación"

SAN JOSÉ DEL CABO, BCS

del 1 al 4 de mayo de 2018

AMIDIQ
Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.



Memorias del XXXIX Encuentro Nacional de la AMIDIQ

**San José del Cabo, BJS, México
1 al 4 de Mayo de 2018**

AMIDIQ
Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.



*“La ingeniería química como motor
de la innovación”*

AMIDIQ
Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.



**La presentación y disposición en conjunto de:
“LA INGENIERÍA QUÍMICA COMO MOTOR DE LA INNOVACIÓN”
son propiedad de sus autores.**

**Coordinador: Guadalupe de la Rosa
Compilador: Ricardo Morales Rodriguez
Compilador: Eduardo Ramírez Sánchez
Compilador: Susana Figueroa-Gerstenmaier
Compilador: Ma. De los Angeles Mendoza
Compilador: Kevin Raúl Arriola González
Compilador: Daniela Hernández González
Compilador: Ramón González Pérez**

**D.R. ©2018, Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química
(AMIDIQ) Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química
ISBN 978-607-95593-6-6
Impreso y hecho en México
Printed in Mexico
Memorias del XXXVIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ 1 al 4 de Mayo de 2018,
San José del Cabo, B.C.S., México**