

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE PERFECCIONAMIENTO

PERIODO 01/04/15 - 19/02/2016

1. APELLIDO: PEREZ

NOMBRES: SILVINA

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: Mar del Plata *CP:* 7600 *Tel:*

Dirección electrónica (donde desea recibir información): ssilvinaperez@gmail.com

2. TEMA DE INVESTIGACIÓN (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

Caracterización y estudio de la cinética de bacterias halófilas quimiotácticas y no quimiotácticas hacia histidina y/o histamina presentes en la maduración de *Engraulis anchoita*

3. OTROS DATOS (Completar lo que corresponda)

BECA DE ESTUDIO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:*

2º AÑO: *Fecha de iniciación:*

BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:* 01/04/15

2º AÑO: *Fecha de iniciación:*

4. INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS

Universidad y/o Centro: Universidad Nacional de Mar del Plata

Facultad: Ingeniería

Departamento: Ingeniería Química y en Alimentos

Cátedra: -

Otros: Grupo de Investigación Preservación y Calidad de Alimentos (GIPCAL)

Dirección: Calle: Av. Juan B. Justo *N°:* 4302

Localidad: Mar del Plata *CP:* 7600 *Tel:* (0223) 4816600

5. DIRECTOR DE BECA

Apellido y Nombres: María Isabel Yeannes

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: Mar del Plata *CP:* 7600 *Tel:*

Dirección electrónica: myeannes@mdp.edu.ar

6. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO. (Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material).

Durante el 1er año de Beca de Perfeccionamiento, se ha continuado trabajando con 58 cepas aisladas durante el 1er año de Beca de Estudio CIC a partir de sal utilizada en el proceso de elaboración de anchoíta salada-madurada, de la etapa de salado de dicho producto y de cepas seleccionadas que habían sido previamente aislados en el subproyecto salado-madurado de anchoíta.

Debido a la dificultad de realizar determinados ensayos por el elevado volumen de materiales y reactivos, los mismos se han ido realizando desdoblado el total de cepas en dos lotes. En primera instancia, se analizaron las cepas aisladas de la sal. Las cepas S9, S10, S11 y S12 dieron respuesta quimiotáctica presunta positiva hacia histidina en los ensayos realizados en placas de swimming. Por otro lado, la cepa S24 presento respuesta positiva hacia histamina.

Con el objetivo de verificar dichos resultados, se realizaron los ensayos que se detallan a continuación:

1) **CURVAS DE CRECIMIENTO** de las cepas quimiotácticas positivas: Por turbidimetría por relación indirecta de densidad óptica (DO) y masa del cultivo. El crecimiento bacteriano se realizó en medios líquidos discontinuos (25°C y 35°C), con agitación (180 rpm). Las bacterias en fase exponencial de crecimiento (medio IRAM con 17,5 % p/p de NaCl) se inocularon en frascos estériles con el mismo medio y agregado de histidina (0,025 % p/v) o de histamina (0,01% p/v) para cepas quimiotácticas positivas hacia histidina e histamina, respectivamente. Se prepararon 50 ml. de cultivo bacteriano en frascos de 250 ml. Se midió DO a 600 nm (espectrofotómetro Shimadzu) a diferentes tiempos. Los resultados se corrigieron frente a un blanco de sales minerales sin fuente de carbono.

2) **MODELADO DE LA CURVAS DE CRECIMIENTO:** Las curvas de crecimiento se ajustaron a un modelo de crecimiento primario mediante la ecuación de Gompertz modificada (Zwietering et al., 1990). Los datos se ajustaron a la ecuación de Gompertz modificada por regresión no lineal (utilizando algoritmo de Marquardt) con OriginPro® software versión 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA). El ajuste y la precisión de las estimaciones de los datos experimentales para cada curva se evaluaron por la suma de cuadrados de los residuos (SCR) y el coeficiente de determinación (R²). Teniendo en cuenta que SCR es una medida de la discrepancia entre los datos y el modelo de estimación, un pequeño SCR indicaría un buen ajuste del modelo. De este modo se identificaron las fases de crecimiento para continuar los ensayos tomando muestras siempre en la fase exponencial.

Este estudio, junto a resultados anteriores, permitió la elaboración del trabajo completo presentado en el XV CYTAL: "Caracterización de bacterias halófilas extremas. Determinación de curvas de crecimiento.", que fue seleccionado para exposición oral.

Luego de evaluar la posible quimiotaxis en las cepas aisladas de la sal, se procedió a realizar los ensayos con las cepas aisladas durante la etapa de salado en el proceso de elaboración de anchoíta salada-madurada:

3) **QUIMIOTAXIS HACIA HISTIDINA E HISTAMINA:** Se realizó prueba de quimiotaxis hacia histidina e histamina en placas de swimming. En cada caso el medio se preparó con única fuente de carbono (0,025% p/v de histidina y 0,05% p/v de histamina

respectivamente), sales minerales y 0,4% p/v de agar y un blanco sin fuente de carbono. Las cepas se sembraron por punción en superficie y se incubó 14 días a 35-37°C. Se consideró respuesta quimiotáctica positiva cuando las cepas formaron un anillo concéntrico alrededor del punto de sembrado esparciéndose con el crecimiento y desplazamiento microbiano hacia los bordes de la placa, siguiendo el gradiente de concentración generado por el consumo.

En este ensayo se adicionó la medición del diámetro de anillo (D-mm) en función del tiempo (t-días) para estimar una velocidad de esparcimiento (V) graficando $\ln(D/D_0)$ vs. tiempo, siendo $V = D^{-1} \cdot dD/dt$.

Las cepas A24 y A25 mostraron respuesta quimiotáctica positiva hacia histidina y la A8 y A18 hacia histamina, esto se confirmará por método de tapón de agarosa y ensayo de capilares. La velocidad $V_{\text{máx}}$ 0,77, 0,52, 0,73 y 0,49 día⁻¹ para las cepas A24, A25, A8 y A18, respectivamente.

Esta experiencia, junto a resultados anteriores, permitió la elaboración del trabajo presentado en las XVI Jornadas Argentinas de Microbiología: "Microorganismos halófilos de anchoíta slada-madurada y su rol en la presencia de histamina", seleccionado para exposición oral.

4) QUIMIOTAXIS FRENTE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO (HISTIDINA E HISTAMINA): Debido a la posibilidad que las cepas presenten diversas respuestas frente a diferentes concentraciones de sustrato, se utilizó el método de formación de anillo quimiotáctico en agar semisólido para todas las cepas que habían dado presuntos positivos anteriormente. Para ello, se utilizaron placas de swimming con 0,25% p/v de agar y 0,025, 0,05, 0,075 y 0,1% p/v histidina o histamina, según correspondiere. Asimismo, se realizó el ensayo frente a un blanco de igual composición pero sin la fuente de carbono y también en un medio igual con tripteína como nutriente adicional. El ensayo se realizó según el método de Wolfe y Berg (1989), sembrando en superficie 5 uL de cultivo en mitad de fase exponencial en el centro de la placa. Se adicionó la medición del diámetro de anillo (D-mm) en función del tiempo (t-días). Resta terminar el análisis de estos resultados, ya que es una técnica en la cual cambios menores en el protocolo o en el entorno de laboratorio pueden afectar los resultados (Morales-Soto et al., 2015). Se incubó a 25°C durante 21 días. Las cepas presuntas positivas no presentaron movilidad en el medio de cultivo formulado con 0,05% p/v de histidina, mientras que en el resto de los medios sí, por lo que aún no se tienen resultados concluyentes.

5) PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA POR HPLC: En el 1er año de Beca de Estudio, se realizó un entrenamiento en SENASA (Laboratorio Regional Mar del Plata) donde se estudió la técnica de cuantificación de histamina en músculo de pescado por HPLC. En el presente, se continúa trabajando en conjunto con la Ing. Qca. Marisa Romero (a/c Dto Contaminantes Químicos y Biológicos, Laboratorio Regional Mar del Plata. SENASA), con quién se realizaron ensayos para determinar la eficacia del método en la cuantificación de histamina en otra matriz, como es el caso del caldo de cultivo utilizado en los ensayos. Se concluyó que el método para músculo de anchoíta es igualmente apropiado para el caldo.

6) IDENTIFICACIÓN DE CEPAS HALÓFILAS DEGRADADORAS DE HISTAMINA:

El objetivo de este ensayo es determinar si alguna de las cepas aisladas tiene capacidad para degradar histamina. Para ello, se prepararon los cultivos de todas las cepas del stock según el método de Tapingkae et al. (2010) con modificaciones. Se realizaron cultivos nuevos en caldo IRAM con 17,5% de NaCl y 5 mM de histamina incubados durante 7 días a 25°C en agitación a 150 rpm. Estos cultivos se

estandarizaron a una densidad óptica (600 nm) de 0,1 y se utilizaron para inocular del mismo caldo en una proporción 5% v/v. Se incubaron durante 7 días a 25°C en agitación a 150 rpm. Se midió nuevamente la densidad óptica y posteriormente los tubos con el caldo se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min. Los 58 cultivos y los blancos se mantienen en refrigeración para ir siendo cuantificado el contenido de histamina por HPLC. Esta última parte de la experiencia se realiza en las instalaciones de SENASA, Laboratorio Regional Mar del Plata, según método acreditado ante la OAA (Organismo Argentino de Acreditación). Por el momento, se han analizado 2 muestras blanco (para las cuales se procedió del mismo modo que con las muestras, pero sin inocular las cepas), el caldo de cultivo puro y los cultivos de 13 cepas, de las cuales 8 presentaron menor contenido de histamina, es decir, que la estarían degradando.

7) PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO DEL TAPÓN DE AGAROSA CON CAPTURA DE VIDEOS (Martínez Arca et al, 2009): Se comenzó a realizar la puesta a punto de la técnica mencionada con sus respectivas capturas de video para poder optimizar el ensayo y verificar los resultados obtenidos por el método de quimiotaxis en placas de swimming. Se realizó la centrifugación y lavados de cultivos extraídos en fase exponencial y la captura de videos al microscopio de los cultivos para verificar movilidad. En función de los resultados que se obtengan en los apartados 4 y 6, se seleccionarán las cepas con las que se continuará con este ensayo.

Por otro lado, se continuó trabajando con la siguiente experiencia:

8) SALADO EN EMPRESA PESQUERA MARPLATENSE DEDICADA AL RUBRO DE SALAZÓN DE *Engraulis anchoita* SALADA-MADURADA

Se continúa con el análisis de datos de pruebas llevadas a cabo durante el 1er y 2do año de Beca, correspondientes a actividad de agua, contenido de agua, penetración de sal y evolución de la flora durante la etapa de salado en la elaboración de anchoíta salada-madurada. Recientemente se realizó la determinación del contenido de lípidos de la muestra fresca de anchoíta y luego de 3 hs de salado, a partir de muestras almacenadas en congelación.

Este estudio permitió la elaboración de dos trabajos para ser presentados en el Congreso FoodInnova (2014), uno de los cuales se encuentra actualmente en prensa:

- "Modificación de la flora microbiológica durante el salado de anchoíta (*Engraulis anchoita*)."

Se prevé en el período restante de beca (hasta el 31 de marzo de 2016), realizar las siguientes actividades:

- a) FINALIZAR IDENTIFICACIÓN DE BATERIAS HALÓFILAS DEGRADADORAS DE HISTAMINA
- b) ENVIAR PAPER A REVISTA CIENTÍFICA INDEXADA

7. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS O PUBLICADOS EN EL PERIODO.

7.1. PUBLICACIONES. Debe hacerse referencia, exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se halla hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC. (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo, en el mismo orden que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde; asignándole a cada uno un número. En cada trabajo que el investigador presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación.

TRABAJOS PRESENTADOS A CONGRESOS

Pérez, Silvina; Sánchez Pascua, Gabriela; Murialdo, Silvia Elena; Yeannes, María Isabel. "Caracterización de bacterias halófilas extremas. Determinación de curvas de crecimiento." Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. XV CYTAL. Buenos Aires. 3 al 5 de noviembre de 2015. Trabajo completo y seleccionado para ponencia oral.

Perez, Silvina; Murialdo, Silvia E.; Yeannes, María I. "Rol de bacterias halófilas en el nivel de histamina de anchoíta madurada". Segundo Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires. Comisión de Investigaciones Científicas (CIC). La Plata. 1 de octubre de 2015. Poster.

Perez, Silvina; Murialdo, Silvia E.; Yeannes, María I. "Microorganismos halófilos de anchoíta salada-madurada y su rol en la presencia de histamina". III Congreso de Bioquímicos del Litoral, XVI Jornadas Argentinas de Microbiología. Colegio de Bioquímicos de Santa Fe y Asociación Argentina de Microbiología. Libro de Resúmenes, código 15-14, página 240. Santa Fe. 5 al 7 de agosto de 2015. Seleccionado para ponencia oral. Disponible en:
<http://acreditaciones.azurewebsites.net/Content/Libro%20de%20res%20C3%BAmenes%20III%20CBL%20XVI%20JAM%20Final.pdf>

7.2. PUBLICACIONES EN PRENSA. (Aceptados para su publicación. Acompañar copia de cada uno de los trabajos y comprobante de aceptación, indicando lugar a que ha sido remitido. Ver punto 7.1.)

Pérez, Silvina; Barañano, Silvia; Murialdo, Silvia; Yeannes, María Isabel. "Modificación de la flora microbológica durante el salado de anchoíta (*Engraulis anchoíta*).". International Conference on Food Innovation – FoodInnova 2014. Concordia - Entre Ríos. 20 al 23 de octubre de 2014.

7.3. PUBLICACIONES ENVIADAS Y AUN NO ACEPTADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar copia de cada uno de los trabajos. Ver punto 7.1.)

7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

Perez, Silvina; Yeannes, María Isabel; Czerner, Marina. "Applicability of empirical predictive models and operational diagrams to assess an industrial salting anchovy process".

7.5. COMUNICACIONES. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores)

7.6. TRABAJOS EN REALIZACIÓN. (Indicar en forma breve el estado en que se encuentran)

8. OTROS TRABAJOS REALIZADOS. (Publicaciones de divulgación, textos, etc.)

8.1. DOCENCIA

8.2. DIVULGACIÓN

Innovar 2015 - Concurso Nacional de Innovaciones

Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva

Título del proyecto: Laser de Speckle dinámico: Novedosa tecnología para discriminar bacterias móviles de hongos filamentosos. ID del proyecto: 17652.

Perez, Silvina; Murialdo, Silvia E.; Passoni, Lucía I.; Guzmán, Marcelo N; Sendra, G. Hernán; Trivi, Marcelo; González, J. Froilán; Rabal, Héctor.

Fecha: 15 al 18 de octubre de 2015.

Presentación de proyecto en stand y publicación en catálogo.

Algunas citas y entrevistas relacionadas:

- "Más propuestas de la región" Diario El Día. 22 de octubre de 2015. Disponible en: <http://www.eldia.com/informacion-general/mas-propuestas-de-la-region-91271>

- "Premian a investigadora de la CIC por avances en fertilización asistida". Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires. 21 de noviembre de 2015. Disponible en: <http://www.cic.gba.gov.ar/destacadas/2015/20151021innovar.htm>

8.3. OTROS

9. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS. (Se indicará la denominación, lugar y fecha de realización y títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas)

2do Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires La Plata. 1 de octubre de 2015.

Comisión de Investigaciones Científicas (CIC).

En carácter de expositor poster.

III Congreso de Bioquímicos del Litoral, XVI Jornadas Argentinas de Microbiología

Colegio de Bioquímicos de Santa Fe y Asociación Argentina de Microbiología.

Santa Fe. 5 al 7 de agosto de 2015.

En carácter de expositor oral.

10. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. (Señalar características del curso o motivo del viaje, duración, instituciones visitadas y si se realizó algún entrenamiento)

Curso de actualización "El conflicto no es conflicto"

Disertante: Ing. Viviana Juarez

Organizado por: Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios. Filial Mar del Plata. Duración: 4 hs.

Duración: 8 hs. Fecha: 17 de diciembre de 2015. Asistencia.

Curso de Postgrado "Introducción al Tratamiento de Efluentes Líquidos"

Docentes: Phd. Jorge Froilán González y Dra. Silvia Elena Murialdo.

Organizado por: Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Mar del Plata.

2do cuatrimestre de 2015. Aprobado. Calificación: 9 (nueve)

Curso de actualización "Inocuidad Alimentaria en la Industria Pesquera"

Organizado por: Oficina de Alimentos de la Prov de Bs. As. (Ministerio de Salud) y SENASA.

Duración: 8 hs. Fecha: 25 de noviembre de 2015. Asistencia.

Curso de Extensión "Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC)"

Docente: Oscar A. Quattrocchi

Organizado por: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata.

Duración: 21 hs. Fecha: 8 al 10 de septiembre de 2015. Aprobado.

Curso de actualización "Tecnología de la Elaboración de Chacinados y Salazones"

Disertante: Ing. Carlos Alberto Almada

Organizado por: Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios. Filial Mar del Plata. Duración: 5

hs. Fecha: 15 de julio de 2015. Asistencia.

11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

-- Trabajos seleccionados para exposición oral en congresos:

"Caracterización de bacterias halófilas extremas. Determinación de curvas de crecimiento."

Pérez, Silvina; Sánchez Pascua, Gabriela; Murialdo, Silvia Elena; Yeannes, María Isabel.

Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. XV CYTAL. Buenos Aires. 3 al 5 de noviembre de 2015.

"Microorganismos halófilos de anchoíta salada-madurada y su rol en la presencia de histamina".

Perez, Silvina; Murialdo, Silvia E.; Yeannes, María I.

III Congreso de Bioquímicos del Litoral, XVI Jornadas Argentinas de Microbiología. Colegio de Bioquímicos de Santa Fe y Asociación Argentina de Microbiología. Libro de Resúmenes, código 15-14, página 240. Santa Fe. 5 al 7 de agosto de 2015.

-- Trabajo seleccionado en Innovar 2015:

Innovar 2015 - Concurso Nacional de Innovaciones

Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva

Título del proyecto: Laser de Speckle dinámico: Novedosa tecnología para discriminar bacterias móviles de hongos filamentosos. ID del proyecto: 17652.

Perez, Silvina; Murialdo, Silvia E.; Passoni, Lucía I.; Guzmán, Marcelo N; Sendra, G. Hernán; Trivi, Marcelo; González, J. Froilán; Rabal, Héctor.

Fecha: 15 al 18 de octubre de 2015.

Elegido entre las 300 innovaciones seleccionadas para presentación de proyecto en stand y publicación en catálogo en competencia de 1300 proyectos.

12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

TRABAJO FINAL DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Ayudante de primera adscripto, por concurso de antecedentes y oposición.

1er y 2do cuatrimestre de 2015. Designación anual.

13. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES (Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período)

14. TITULO DEL PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PERIODO DE PRORROGA O DE CAMBIO DE CATEGORÍA (Deberá indicarse claramente las acciones a desarrollar)

Condiciones de Presentación

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Becario, la que deberá incluir:
- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
 - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
 - c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

Nota: El Becario que desee ser considerado a los fines de una prórroga, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.

.....
Firma del Director

.....
Firma del Becario