

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE ESTUDIO

PERIODO 01/04/2014 a 12/09/2014

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 de bacterias halófilas de *Engraulis anchoita* quimiotácticas hacia histidina y/o histamina

3. OTROS DATOS (Completar lo que corresponda)

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

2º AÑO: *Fecha de iniciación:* 01/04/2014

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

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

Cátedra: -

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

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

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

5. DIRECTOR DE BECA

Apellido y Nombres: YEANNES, María Isabel

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).

Se está trabajando con 58 cepas aisladas (durante el 1er año de Beca de Estudio) a partir de la 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.

Con el objetivo de identificar microorganismos autóctonos de la anchoíta salada y madurada, se realizaron los puntos 1 y 2:

1) IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE MICROORGANISMOS

A la totalidad de las cepas se les realizaron las siguientes pruebas fenotípicas: tinción de gram (Merck, 1994), movilidad, catalasa, oxidasa, citrato, hidratos de carbono (glucosa, lactosa y sacarosa) e indol de acuerdo a la metodología de Mc Faddin (1980).

2) IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS

Se está realizando la identificación molecular de los microorganismos aislados con amplicones 16S. Por el momento, se ha realizado la amplificación con primers para bacterias y se han identificado *Lentibacillus/Virgibacillus* (porcentaje de identidad: 94%), *Chromohalobacter canadensis* (porcentaje de identidad: 98%), *Chromohalobacter spp.* (porcentaje de identidad: 97%), *Lentibacillus spp.* (porcentaje de identidad: 93%) y *Staphylococcus haemolyticus* (porcentaje de identidad: 99%). Para las muestras que no se logró la amplificación con estos primers, se analizaron los resultados de las pruebas fenotípicas y del rango de salinidad en el que crecen (punto 5) para estimar si era necesario repetir con primers de bacterias o utilizar primers de arqueas. Ya se ha realizado la extracción del DNA por el método del hervido, se ha llevado a cabo la PCR con amplicones 16S y un posterior liofilizado. Las muestras liofilizadas se han enviado a secuenciar a través de un convenio laboral con el Dr. Narjol Gonzalez-Escalona, Ph.D.

Microbial Methods and Subtyping Branch
Division of Microbiology
Office of Regulatory Science
Center for Food Safety and Applied Nutrition
5100 Paint Branch Pkwy.
College Park, MD 20740

Por el momento, se ha trabajado con la mitad de las cepas aisladas. En función de los resultados se realizará con el resto de las cepas.

A partir de la etapa de salado del proceso de elaboración de anchoíta salada-madurada, se aislaron 30 cepas de halófilas diferenciandolas por sus características morfológicas. A fin de establecer la importancia de dichas cepas, se han realizado las siguientes pruebas de importancia para el proceso:

3) ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA: Se determinó mediante siembra en agar leche (extracto de levadura, 3 g/L; peptona de carne, 5 g/L; solución de leche descremada, 10 g/L; agar, 15 g/L) (FIL IDF 73, 1974), al cual se le agregó NaCl, KCl y sal de Mg²⁺. Las placas fueron incubadas a 35±0,5°C hasta la obtención de un buen desarrollo, considerando el ensayo positivo cuando fue posible observar aureolas o zonas claras alrededor de las colonias desarrolladas. Los resultados muestran que de 30 cepas aisladas, el 37% son proteolíticas.

4) ACTIVIDAD LIPOLÍTICA: Se utilizó un medio sólido conteniendo tributirina (FIL IDF 73, 1974), suplementado con NaCl, KCl y sal de Mg²⁺. Se sembraron por estriado en superficie y fueron incubadas a 35±0,5°C hasta observar un buen crecimiento. Se consideró el ensayo positivo con la aparición de un halo más claro alrededor de las colonias. Los resultados muestran que de 30 cepas aisladas, el 47% son lipolíticas.

5) RANGO DE SALINIDAD: Se evaluó el crecimiento en medio IRAM con diferentes concentraciones de NaCl. La totalidad de las cepas aisladas crece con 15% p/v de NaCl. El

83% de las cepas crece con 5% p/v de NaCl, 87% con 10% p/v de NaCl, el 87% con 20% p/v de NaCl y 60% con 25% p/v de NaCl.

Las pruebas 3), 4) y 5) también fueron llevadas a cabo para las cepas procedentes de la sal y para las seleccionadas del subproyecto salado-madurado de anchoíta. De estas 28 cepas, solo 8 presentan actividad lipolítica y 5 proteolítica.

A partir de los resultados obtenidos en las pruebas 1 a 5 para las cepas aisladas de las muestras de sal, se realizó la siguiente presentación del trabajo "Microbiological analysis of salt used in the process of salting fish" en el Congreso SAMIGE:

Por otro lado, se evaluaron características de interés para los objetivos del Plan:

6) **CRECIMIENTO EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO:** Su importancia radica en que se utilizarán para los ensayos en biorreactores las cepas que presentan crecimiento en caldo. En caso que cepas formadoras o degradadoras de histamina no crezcan en caldo de cultivo, se evaluará la posibilidad de agregar algún soporte sólido que ayude a su desarrollo.

7) **QUIMIOTAXIS HACIA HISTIDINA:** Se realizó el método de formación de anillo quimiotáctico en agar semisólido. Para ello, se utilizaron placas de swimming con 0,25% de agar y los resultados se evaluaron frente a un blanco de igual composición pero sin la fuente de carbono (histidina). Se determinó que al menos 8 de las 60 cepas dan resultados positivos de quimiotaxis hacia histidina, dado que presentaron el típico anillo de crecimiento esperado en el medio con histidina y no lo presentaron en el blanco.

8) **QUIMIOTAXIS HACIA HISTAMINA:** No se hallaron aun resultados concluyentes de este ensayo dada la dificultad que se presentó con el medio de cultivo que contenía histamina como única fuente de carbono. Los medios para los ensayos de quimiotaxis (punto 7 y 8) se prepararon de igual forma (idénticas concentraciones de sales y de agar, solo variando la fuente de carbono suministrada). Sin embargo, el medio de cultivo utilizado para quimiotaxis hacia histamina no permitió observar los resultados. Por tal motivo, este ensayo se repetirá realizando modificaciones en su composición para mejorar la performance.

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

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

Se realizó el análisis de datos de pruebas llevadas a cabo durante el 1er año de Beca, correspondientes al cálculo de 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. Dentro de la microflora, se realizó el seguimiento tanto de la flora deteriorante y/o patógena potencialmente presente en el producto, como de la flora halófila. A este último grupo se le realizarán las pruebas mencionadas en los puntos 1 a 8.

Este estudio permitió la elaboración de los siguientes trabajos para ser presentados en el Congreso FoodInnova:

- "Efecto de la temperatura en la deshidratación osmótica de anchoíta (Engraulis anchoíta)."
- "Modificación de la flora microbiológica durante el salado de anchoíta (Engraulis anchoíta)."

Se prevé para los meses restantes (hasta el 31 de marzo de 2015) correspondientes al 2do año de la Beca de Estudio, realizar los siguientes ensayos:

a) **OPTIMIZACIÓN DE ENSAYOS DE QUIMIOTAXIS HACIA HISTIDINA E HISTAMINA**

Se repetirán los ensayos por el método de formación de anillo quimiotáctico en agar semisólido utilizando placas de swimming (0,25-0,4% agar) o swarming (0,5-0,7% agar), realizando modificaciones en su composición para mejorar la performance.

b) **COMPROBACIÓN DE LOS RESULTADOS DE QUIMIOTAXIS**

Los resultados presuntos positivos del punto a) deben comprobarse mediante otras técnicas. A tal fin, se llevarán a cabo el método de la gota (drop assay) y el método de los capilares (capillary assay) (Samanta et al., 2000).

c) EVALUAR CONDICIONES PARA EL MONTAJE DEL REACTOR.

Para la puesta en marcha del reactor es necesario conocer las condiciones óptimas de crecimiento de los microorganismos que se seleccionen para esta experiencia. Para ello, se evaluará el rango óptimo de temperatura, oxígeno, pH y la posibilidad de un soporte que favorezca el crecimiento.

d) PUESTA A PUNTO DE LA CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA POR HPLC

En el 1er año de Beca, 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. A continuación, se realizará la puesta a punto de la técnica de cuantificación de histamina por HPLC a partir de los caldos de cultivo a ser utilizados para las experiencias en biorreactores, con el equipo HPLC disponible en el GIB (Grupo de Ingeniería Bioquímica).

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.

A partir del 1ro de abril de 2014:

3 - "Microbiological analysis of salt used in the process of salting fish."

Autores: Pérez, Silvina; Nisembaum, Melina; Barañano, Silvia; Murialdo, Silvia; Yeannes, María Isabel.

X Congreso Argentino de Microbiología General
Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGE)

Libro de resúmenes. Código de resumen: BD-006

Fecha: 2 al 4 de julio de 2014. Lugar: Mar del Plata.

4 - "Hydrocarbon degrading microorganisms from bilge oil waters of Mar del Plata port ships and their growth capacity in different ship wastewaters."

Autores: Nisembaum, Melina; Pérez, Silvina; Murialdo, Silvia.

X Congreso Argentino de Microbiología General
Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGE)

Libro de resúmenes. Código de resumen: MS-024

Fecha: 2 al 4 de julio de 2014. Lugar: Mar del Plata.

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.)

1 - "Efecto de la temperatura en la deshidratación osmótica de anchoíta (Engraulis anchoíta)."

Autores: Pérez, Silvina; Barañano, Silvia; Murialdo, Silvia; Yeannes, María Isabel.

International Conference on Food Innovation – FoodInnova 2014

Fecha de congreso: 20 al 23 de octubre de 2014. Lugar: Concordia - Entre Ríos.

Modalidad: Resumen. Estado: Aprobado.

2 - “Modificación de la flora microbiológica durante el salado de anchoíta (*Engraulis anchoíta*).”

Autores: Pérez, Silvina; Barañano, Silvia; Murialdo, Silvia; Yeannes, María Isabel.

International Conference on Food Innovation – FoodInnova 2014

Fecha de congreso: 20 al 23 de octubre de 2014. Lugar: Concordia - Entre Ríos.

Modalidad: Resumen. Estado: Aprobado.

7.3. PUBLICACIONES ENVIADAS Y AUN NO ACEPTADAS PARA SU PUBLICACIÓN.

(Adjuntar copia de cada uno de los trabajos. Ver punto 7.1.)

1 - “Modificación de la flora microbiológica durante el salado de anchoíta (*Engraulis anchoíta*).”

Autores: Pérez, Silvina; Barañano, Silvia; Murialdo, Silvia; Yeannes, María Isabel.

International Conference on Food Innovation – FoodInnova 2014

Fecha de congreso: 20 al 23 de octubre de 2014. Lugar: Concordia - Entre Ríos.

Modalidad: Trabajo Completo. Estado: En revisión.

7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN.

(Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

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)

1) IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS

Se han impuesto los métodos genotípicos de identificación bacteriana como procedimientos complementarios o alternativos a los sistemas de identificación fenotípica para solventar los problemas inherentes asociados a estos últimos (no todas las cepas de una misma especie muestran una característica específica; una misma cepa puede generar diferentes resultados en ensayos repetidos; y las limitaciones en la base de datos de bacterias correspondiente, entre otros). Por ello, se ha incluido en el Plan de Trabajo la identificación molecular. Se está realizando la identificación tanto por métodos dependientes del cultivo, como el método de hervido de cada colonia aislada y posterior PCR, como por métodos independientes del cultivo (metagenómica), como el método del CTAB.

En el apartado 6 del presente informe se explicó el estado en el que se encuentran las identificaciones moleculares por métodos dependientes del cultivo de aproximadamente la mitad de los microorganismos con los que se está trabajando (28 cepas). Una parte del ensayo (extracción de DNA, amplificación del gen 16s y liofilización) se ha llevado a cabo en nuestras instalaciones y aún resta recibir los resultados de la secuenciación. Por otro lado, en octubre de 2013 se realizó la extracción de DNA por métodos independientes del cultivo (metagenómica), como el método del CTAB, de muestras de sal utilizadas en el proceso de elaboración de anchoíta salada-madurada. De este método, resta concluir la secuenciación.

2) QUIMIOTAXIS HACIA HISTIDINA Y/O HISTAMINA: Tal como se explicó en el apartado 6 del presente informe, se realizarán nuevas experiencias a fin de ajustar los medios de cultivo y evaluar la quimiotaxis hacia histidina y/o histamina.

3) TRANSFERENCIA A EMPRESA PESQUERA MARPLATENSE DEDICADA AL RUBRO DE SALAZÓN DE ENGRAULIS ANCHOITA SALADA-MADURADA

Desde septiembre de 2013 se está realizando un trabajo de transferencia a la empresa pesquera marplatense dedicada al rubro de salazón de *Engraulis anchoíta* salada-madurada en el cual se ha realizado la toma de muestras de anchoíta durante las primeras 48 hs del proceso de salado y se ha estudiado la actividad de agua, contenido de agua, penetración de sal y recuento de microorganismos, entre ellos, los halófilos. Se ha determinado si los microorganismos halófilos

hallados son formadores de histamina, se ha realizado parte de la identificación fenotípica y se ha determinado si poseen capacidad lipolítica y/o proteolítica.

4) TRABAJOS EN REDACCIÓN

Se están redactando trabajos para enviar a publicar en revistas internacionales arbitradas y en otros casos se están analizando resultados.

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

8.1. DOCENCIA

8.2. DIVULGACIÓN

"Becaria CIC participa en desarrollo reconocido con el premio INNOVAR"

Fecha: mayo de 2014.

Disponible en: <http://www.cic.gba.gov.ar/destacadas/2014/20140522batata.htm>

"Vodka de batata, made in Argentina"

Diario Hoy. Ciudad de La Plata.

Fecha: 25 de mayo de 2014.

Disponible en: <http://diariohoy.net/interes-general/vodka-de-batata-made-in-argentina-27279>

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)

X Congreso Argentino de Microbiología General

Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGE)

Fecha: 2 al 4 de julio de 2014. Lugar: Mar del Plata.

Presentación de posters:

"Microbiological analysis of salt used in the process of salting fish."

"Hydrocarbon degrading microorganisms from bilge oil waters of Mar del Plata port ships and their growth capacity in different ship wastewaters."

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)

METODOLOGÍAS DE CONTROL: ALERGENOS Y SANITIZACIÓN

Docente: Dra. Cristina D'Aiutolo

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

Duración: 4 hs. Fecha: 9 de septiembre de 2014. Asistencia.

PRINCIPIOS BÁSICOS DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Docente: Msc. Gustavo Locati

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

Duración: 8 hs. Fecha: 8 de julio de 2014. Aprobado.

INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL

Docente: Ing. Pablo F. Paz.

Organizado por: Subsecretaría de Transferencia y Vinculación Tecnológica, Universidad Nacional de Mar del Plata.

Duración: 32 hs. Fecha: 22 al 29 de abril de 2014. Asistencia. ACA NO HUBO EVALUACION?

11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

Ayudante de primera adscripto en “Termodinámica”

Facultad de Ingeniería – Universidad Nacional de Mar del Plata. 1º cuatrimestre de 2014.

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)

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*

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