

Supl. 1
VOL 42
2010

REVISTA ARGENTINA DE
MICROBIOLOGÍA

PUBLICACIÓN
DE LA
ASOCIACIÓN ARGENTINA
DE
MICROBIOLOGÍA

cidad en células Vero, la detección fenotípica de la enterohemolisina, y serotipificación. Para la subtipificación se utilizaron las técnicas de electroforesis de campo pulsado (PFGE), fagotipificación y genotipificación de stx. Los patrones de PFGE se compararon con la Base de Datos Nacional con cepas de diferentes orígenes aisladas desde el año 1988. Del total de los 96 aislamientos recibidos, 68 (70.8%) fueron identificados como STEC. La frecuencia de aislamiento de STEC en cada tipo de alimento fue la siguiente: carne picada (24 cepas), hamburguesas (26), carne bovina (15), y chacinados (3). Un total de 34 cepas STEC fueron caracterizadas como O157:H7 stx2/eae/ehxA (11 cepas); O157:H7 stx1/stx2/eae/ehxA (6); O174:H21 stx2 (6); O91:H21 stx2/ehxA/saa (3); O113:H21 stx2/ehxA/saa (2); O22:HNT stx2 (2); O22:H11 stx1/stx2/ehxA/saa (1); O8:H19 stx2/ehxA (1); O104:H7 stx2 (1); y O128:HNT stx2 (1). Sin embargo, las restantes 34 cepas STEC con diferentes genotipos de stx no pudieron ser serotipificadas. Es importante destacar la detección de 14 cepas de *E. coli* O157 que no portaban el gen stx: O157:H7 eae/ehxA (1 cepa); O157:NM (5); O157:H16 eae (4); O157:HNT (4). Las 17 cepas STEC O157:H7 eae/ehxA con alto potencial virulento que se recuperaron de muestras de carne bovina y productos cárnicos. Al realizar la comparación con las cepas incluidas en la BDN, se observó que 3/17 cepas STEC O157:H7 eae/ehxA presentaron idéntico perfil de virulencia y fueron indistinguibles por PFGE (AREXHX01.0011; AREXHX01.0093; AREXHX01.0153) de cepas aisladas fundamentalmente, de casos de SUH y diarrea sangüinolenta. Para la prevención de las enfermedades asociadas a STEC, la detección de este patógeno en alimentos representa un desafío para la industria y los organismos de control. Para ello, es fundamental la aplicación de metodologías estandarizadas y normalizadas a través de la regulación nacional.

P448 - 27915 ACTIVIDAD KILLER DE LEVADURAS AISLADAS DE AMBIENTES ENOLÓGICOS FRENTE A LEVADURAS CONTAMINANTES DEL VINO, A DIFERENTES PH. MATURANO, YOLANDA PAOLA; ZAPATA, M JOSE(1,2); TORO, M EUGENIA(2); MUÑOZ, M ANDREA(1,2); COMBINA, MARIANA(3); STURM, M ELENA(3); ROJO, M CECILIA(3); VAZQUEZ, FABIO(2)

(1) Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales -UNSJ (2) Instituto de Biotecnología - UNSJ, (3) CEE-EEA-INTA

Introducción: en la naturaleza, existen levaduras capaces de secretar toxinas (denominadas "killer") que pueden ejercer un efecto letal sobre otras especies de levaduras y hongos filamentosos. Desde una perspectiva de microbiología aplicada, las levaduras killer han sido postuladas como biocontroladoras de contaminaciones fúngicas en alimentos y fermentaciones. Sin embargo, su uso industrial es limitado debido a la falta de datos cuantitativos sobre la productividad, actividad y estabilidad de las toxinas. Las levaduras de los géneros *Brettanomyces* y *Zigosaccharomyces* pueden contaminar vinificaciones produciendo *flavors* desagradables, además de perjudicar la calidad general del producto. Para prevenir las contaminaciones por estas levaduras, se han implementado varias alternativas: higiene rigurosa en bodegas, uso de preservantes químicos, filtración, entre otras. Sin embargo, la presencia de microorganismos contaminantes en algunos vinos demuestra que estos métodos tradicionales no son tan efectivos y evidencia la necesidad de nuevos métodos que logren la estabilidad microbiológica de los vinos. En este contexto, resulta interesante la exploración de levaduras killer capaces de contrarrestar la actividad de microorganismos indeseados. **Objetivo:** detectar actividad killer de levaduras autóctonas, a diferentes pH, contra levaduras contaminantes del vino. **Materiales y Métodos:** Se emplearon 226 cepas de levadura autóctonas pertenecientes al Cepario del Instituto de Biotecnología-UNSJ: 91 no-*Saccharomyces*, 135 *Saccharomyces* sp.; y 4 cepas de referencia, *S. cerevisiae*: CECT891 K(+), ATCC36900 K(+) ATCC38636 K(-), NCYC1006 K(-). La actividad killer se evaluó en placa, mediante reacción cruzada con las levaduras contaminantes *Brettanomyces bruxellensis*: E9, F1 y *Zigosaccharomyces rouxii*: MR6, MC10. Se usaron como controles positivos a *S. cerevisiae* ATCC38636 K(-) y NCYC1006 K(-). Se empleó el medio YPD-

Agar-azul de metileno (0,03%) tamponado (McIlvaine) a diferentes valores de pH: 4, 4,4 y 4,8. Las placas fueron incubadas a 25°C, durante 72h. La presencia de actividad killer se confirmó mediante la formación de halos de inhibición alrededor de las colonias de levaduras. Los mismos se midieron y se calculó el parámetro Pz (radio de la colonia/radio de la colonia + radio del halo). **Resultados:** Se obtuvo el máximo registro de levaduras biosupresoras cuando las mismas se desarrollaron a pH 4,4. A este valor de pH, las cepas *Debaryomyces vanrijiae* BDv566, *Candida sake* BCs403, *C. parapsilosis* BCp272 inhibieron a las levaduras contaminantes E9, F1 y MR6. La levadura *C. sake* BCs370 formó halos de inhibición en todos los lawn ensayados a pH 4,8 y 4 (excepto en NCYC1006). **Conclusión:** las levaduras no-*Saccharomyces* ensayadas mostraron que poseen amplia actividad antimicótica frente a levaduras contaminantes del ambiente enológico. La aplicación de levaduras killer puede considerarse una alternativa para eliminar levaduras que perjudican el vino.

P449 - 27925 OCURRENCIA DE VT2DACT EN *Escherichia coli* VEROTOXIGÉNICO AISLADO DE BOVINOS Y ALIMENTOS CÁRNICOS EN ARGENTINA, Y SU RELACIÓN CON OTROS FACTORES DE VIRULENCIA. KRUGER, ALEJANDRA(1,2); LUCCHESI, PAULA MA(1,2); PARMA, ALBERTO E(1,3)

(1) Lab. de Inmunoquímica y Biotecnología. FCV-UNCPBA. Tandil. (2) CONICET, (3) Comisión de Investigaciones Científicas

Introducción: *Escherichia coli* verotoxigénico (VTEC) es un patógeno entérico que puede causar severas enfermedades en humanos, tales como colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH). Las verotoxinas son el factor de virulencia más importante de este patógeno. Diversos estudios identificaron variantes de los genes vt, y sugieren que el resultado clínico de la infección por VTEC depende del genotipo de la cepa infectante. En particular, las variantes vt2EDL933y vt2dact están asociadas a cepas de mayor virulencia y al desarrollo de SUH. La característica principal de la variante vt2dact es que puede activarse en presencia de mucus intestinal o elastasa, aumentando 10 a 1000 veces la citotoxicidad en células Vero. Al momento hay escasa información sobre la ocurrencia de la variante vt2dact en muestras obtenidas de ganado bovino, principal reservorio de VTEC. **Objetivo:** Nuestro objetivo fue investigar la presencia de vt2dact en cepas VTEC aisladas de bovinos y alimentos en Argentina y evaluar su relación con otros factores de virulencia y el serotipo. **Materiales y métodos:** Se estudiaron 161 aislamientos VTEC vt2-positivos, previamente caracterizados respecto a otras variantes de vt2 y a la presencia de genes eae, saa (ambos codificantes de proteínas de adherencia) y al gen ehxA (codificante de una enterohemolisina). La presencia del gen vt2dact se evaluó por medio de una PCR específica en la cual el "primer forward" es homólogo a la secuencia codificante de la región peptídica 42 reconocida por la elastasa. **Resultados:** Detectamos el gen vt2dact en 13% (21/186) de los aislamientos vt2-positivos, pertenecientes a los serotipos O2:H25, O8:H19 O15:H21, O20:H19, O25:H19, O79:H19, O91:H21, O113:H21, O171:H2, O175:H8, ONT:H7 y ONT:H19. Todos los aislamientos vt2dact-positivos fueron eae-negativos. Doce (57%) de los aislamientos portaban el gen ehxA de los cuales siete tenían además el gen saa. Se encontró que poseían genotipo vt2dact cepas portadoras de la variante vt2EDL933 como también cepas portadoras de otras variantes de vt2, como vt2vha, vt2vhb y vt2g. Los resultados muestran que cepas VTEC aisladas de ganado bovino y productos cárnicos en Argentina portan la variante vt2dact que ha sido propuesta como indicadora de VTEC con alto potencial patogénico, y ha sido detectada en nuestro país en un alto porcentaje de cepas VTEC eae-negativas aisladas de casos de SUH.

P450 - 27958 CARACTERIZACIÓN DE *Escherichia coli* VEROTOXIGÉNICA (VTEC) DEL SEROTIPO O130:H11 AISLADA DE BOVINOS DE TAMBOS DE ARGENTINA. FERNANDEZ, DI(1,3); KRUGER, A(1,3); BUSTAMANTE, AV(1,3); SANSO, MA(1,3); POLIFRONI, R(1,3); SANZ, ME(1); ARROYO, GH(1,3); LUCCHESI, PA(1,3); PADOLA, NL(1,2); PARMA, AE(1,2)

(1) Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, - (2) CIC - (3) CONICET, Dpto. de Sanidad Animal y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro, Tandil.

Introducción: VTEC es causante de brotes y casos esporádicos de diarrea, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH) a través de la producción de verotoxinas (VT1 y VT2), y factores de virulencia adicionales. Argentina posee la mayor incidencia de SUH a nivel mundial (15,5/100000) en niños menores de 5 años. Los tambos pueden contribuir al riesgo de infección por VTEC a través de la leche y productos lácteos sin pasteurizar. En un estudio realizado en nuestro laboratorio se obtuvo una prevalencia de VTEC del 37,5% en bovinos lecheros de Argentina y el serotipo aislado con mayor frecuencia fue O130:H11. Éste y otros de los serotipos identificados en ese trabajo, han sido aislados de pacientes con diarrea, CH y SUH en otros estudios. Objetivo: caracterizar geno-fenotípicamente cepas de VTEC del serotipo O130:H11. Materiales y métodos: 37 cepas del serotipo O130:H11 obtenidas de 5 tambos diferentes fueron caracterizadas. Se determinaron los factores de virulencia (*vt1*, *vt2*, *ehxA*, *eae* y *saa*) por PCR multiplex y variantes *vt* por PCR y PCR-RFLP. Se realizaron PCR multiplex para los genes *cri*, *csgD* y *csgA* implicados en la síntesis de la fimbria curli, y para el gen *sab* que codifica para una nueva adhesina autotransportada. Además, se determinó el efecto citotóxico en células Vero. Los aislamientos fueron subtipificados mediante MLVA (*multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis*) para lo cual se analizaron por PCR siete *loci* VNTRs genéricos para *E. coli*. Se calculó la diversidad genética para cada locus VNTR utilizando el índice de Nei. Resultados: por multiplex PCR se determinó que 36 cepas presentaron un perfil de virulencia: *vt1*, *vt2*, *saa*, *ehxA* y una cepa el perfil: *vt1*, *saa*, *ehxA*. La variante predominante entre las cepas *vt2*-positivas fue *vt2EDL933*. Se presentaron los genotipos *vt2EDL933* (27/36), *vt2vhb* (6/36) y *vt2EDL933-vt2vhb* (3/36). Las variantes *vt2vha*, *vt2d*, *vt2NV206* y *vt2g* no se detectaron entre los aislamientos estudiados. Todas las cepas presentaron efecto citotóxico visible a las 48 h de cultivo. La totalidad de las cepas fueron portadoras de los genes *cri*, *csgD* y *csgA*, mientras que el gen *sab* se encontró en 23 de 37 cepas. Se encontró un único perfil de MLVA y un *locus*, el CVN003, mostró alelo nulo. Conclusiones: La presencia de genes de virulencia relacionados con enfermedad en el hombre junto con la observación del efecto citotóxico en células sensibles a la acción de las VTs demuestra el potencial patógeno de aislamientos de este serotipo. La falta de diversidad genética evidenciada por los ensayos de MLVA, podría estar indicando que O130: H11 sería un serotipo emergente.

P451 - 27982 CREACIÓN DE UN CEPARIO DE LEVADURAS VÍNICAS. SANCHEZ, MIAURA; PALADINO, S; BERNARDI, M; VARGAS, E; MAZA, M; FORMENTO, JC; SFREDDO, E; FARRANDO, S

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo

El uso de levaduras seleccionadas es una práctica habitual en las bodegas de Mendoza. Aunque la oferta comercial está basada en microorganismos importados, existe una tendencia a vinificar con levaduras autóctonas de la misma zona de elaboración por estar adaptadas a las condiciones agroclimáticas y de materia prima. Los consumidores demandan nuevos estilos de vino proporcionando desafíos en la innovación de la tecnología de fermentación. De allí la importancia de investigar levaduras con características adecuadas de vinificación. La Facultad de Ciencias Agrarias (UNCuyo) cuenta con una colección de levaduras provenientes de uvas de viñedos de la Prov. de Mendoza. Trabajos anteriores de aislamiento y selección de levaduras permitieron conformar un cepario de más de 500 cepas. El objetivo principal de las colecciones de microorganismos es mantener a éstos puros, viables y estables. Todo trabajo de microbiología requiere conocer las propiedades de la población a estudiar. La caracterización enológica de levaduras consiste en identificar cepas que presenten adecuadas propiedades tecnológicas y cualitativas. Las primeras responden a la eficiencia de la levadura en el proceso

de fermentación y las segundas ayudan a determinar la composición química y la participación en las cualidades sensoriales de los vinos. El objetivo de este trabajo es evaluar las cepas de los Departamentos de Luján de Cuyo, Tupungato y Maipú según estas características con el fin de elaborar un catálogo de estos microorganismos con su descripción para ser seleccionados según objetivos particulares. En cada cepa se evaluó viabilidad y pureza y se acondicionaron nuevamente para su mantenimiento. Se realizaron las descripciones macro y microscópicas y se evaluaron características tecnológicas: tolerancia al etanol, cinética de fermentación, resistencia al anhídrido sulfuroso, formación de sedimento y de espuma y características cualitativas: formación de ácido acético y ácido sulfhídrico. Hasta el momento se procesó el 52% de un total de 221. La totalidad se mostraron viables y puras y respondieron a la descripción de *Saccharomyces* spp. En cuanto a las características tecnológicas, el 79% mostró tolerancia al etanol (15%v/v). En el poder de fermentación, las levaduras de mayor desprendimiento de CO₂ mostraron un promedio de 6,2g en 12 días de fermentación. La resistencia al SO₂ fue variable: el 20% toleró concentraciones de 100 ppm, el 18% creció a 200 ppm, mientras que el 62% resistió 300 ppm. Todas las levaduras presentaron sedimento. La producción de espuma fue mínima en el 64% y media en el 21% de las cepas. Con respecto a las características cualitativas, sólo el 8% desarrolló concentraciones medias de acidez volátil y el 30% produjo cantidades leves de H₂S. Este trabajo permite optimizar recursos biológicos para la fermentación alcohólica de mostos. Es posible afirmar que en esta colección existen individuos capaces de fermentar vinos con elevados porcentajes de alcohol y que aseguren el final de fermentación. También hay levaduras poco productoras de espuma, acidez volátil y H₂S. La selección de levaduras locales representa una clara ventaja frente a otras cepas comercialmente más difundidas. Esto es importante para la preservación y explotación de la biodiversidad de levaduras de la Prov. de Mendoza

P452 - 27986 EVALUACIÓN DE LA MICROFLORA, OCURRENCIA NATURAL DE MICOTOXINAS Y COMPOSICIÓN NUTRICIONAL EN ALIMENTOS BALANCEADOS DESTINADOS A LA PRODUCCIÓN DE ANIMALES DE GRANJA EN ALTO VALLE (RN). GRECO, MARIANA(1,3); FRANCHI, LUISA(2); LUDEMANN, VANESA (1); PARDO, ALEJANDRO(1); POSE, GRACIELA(1,2,3)

(1) Universidad Nacional de Quilmes, (2) Universidad Nacional de Río Negro, (3) CONICET

La presencia de hongos y micotoxinas en alimentos balanceados deriva de la utilización de materias primas contaminadas durante los períodos de cosecha o posteriores. La ingesta excesiva de alimentos contaminados con micotoxinas puede tener efectos adversos tanto en la salud animal como en la productividad. En Argentina es muy escasa la información disponible acerca de la presencia natural de micotoxinas y microflora en los alimentos destinados a aves de granja. El objetivo del presente trabajo fue cuantificar, aislar e identificar la flora fúngica, determinar la presencia de las principales toxinas implicadas en micotoxicosis en animales (aflatoxinas, deoxinivalenol, fumonisina, T2, ocratoxina y zearalenona) y evaluar la calidad nutricional de los alimentos balanceados destinados a la alimentación de aves de granja (pollo y choique). Sobre 17 muestras de alimentos balanceados analizados hasta el momento, se llevó a cabo el recuento total de mohos en tres medios de cultivo: DRBC, DG18 y DCPA (para recuento general, de hongos xerófilos y aislamiento de especies de *Alternaria* y *Fusarium*, respectivamente). La determinación de micotoxinas se realizó por la técnica de ELISA empleando los tests R-Biopharm (aprobados por la AOAC). Se determinaron proteínas por el método Kjeldahl, lípidos por el método de Soxhlet, humedad y cenizas. Se obtuvieron recuentos comprendidos entre 2.1 y 1,6.10⁶ UFC/g en DRBC; entre 5.1 y 1,4.10⁶ UFC/g en DG18 (predominancia de *Eurotium* spp.) y entre 1.1 y 1,3.10⁶ colonias en DCPA. En general, la frecuencia y los géneros fúngicos determinados fueron *Fusarium* (34,90%), levaduras (23,91%), *Cladosporium* (9,88%), *Penicillium* (7,29%), *Aspergillus* (7,27%), *Eurotium* (3,15%) y otros (13,60%). Las especies halladas fueron *Fusarium proliferatum*, *Cladosporium cladosporioides*,