



Biotecnia

Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud editada por la Universidad de Sonora



indexada en



IC Journal Master List

e-revist@s



Miembro de



Pertenece al Sistema de Clasificación de Revistas Mexicanas de Ciencia y Tecnología del CONACYT



<http://biotecnia.unison.mx>

BIOTECNIA, 2021, 23, Número 3 (septiembre – diciembre), es una publicación electrónica cuatrimestral editada por la Universidad de Sonora, a través de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, con domicilio en Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Col Centro, Hermosillo, Sonora, México, C.P.83000, página web: <https://www.biotecnia.unison.mx>, correo-e: biotecnia.difusion@unison.mx. Editor responsable del número: Enrique Márquez Ríos.

Reserva de Derechos al Uso Exclusivo 004-2022-061515171200-102. ISSN: 1665-1456; ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación. Se autoriza la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes en la presente publicación, siempre y cuando se cuente con la autorización del editor y se cite plenamente la fuente.



La revista Biotecnia se encuentra bajo la licencia Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)

Contenido

Tipo	Páginas	Artículo
Original	pp 5-13	Frecuencia, distribución territorial y resistencia a los antimicrobianos de <i>Salmonella</i> spp. aislada de heces de ganado bovino de la región Altos Sur en el estado de Jalisco, México
Original	pp 14-21	Crecimiento, acumulación y distribución de materia seca en dos variedades de amaranto (<i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>A. cruentus</i>) bajo fertigación
Original	pp 22-29	Evaluación del desarrollo y la estabilidad de una nanoemulsión de vainilla (<i>Vanilla planifolia</i>) a partir de un extracto no alcohólico
Original	pp 30-37	Rendimiento de <i>Litopenaeus vannamei</i> a diferentes niveles de ingesta diaria de proteína y proporciones carbohidrato/proteína en alimentos formulados con baja inclusión de harina de pescado
Original	pp 38-44	Emergencia y características agronómicas del <i>Cucumis sativus</i> a la aplicación de quitosano, <i>Glomus cubense</i> y ácidos húmicos
Original	pp 45-49	Modelación matemática para la generación de etanol, metanol y acetaldeído durante el proceso de vinificación de uva Mexicana carignane (<i>Vitis vinifera</i>)
Original	pp 50-57	Efecto de la inclusión de inulina (prebiótico) y <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Lactobacillus</i> sp. (probiótico) en el alimento, sobre la microbiota intestinal del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i>
Original	pp 58-65	Efecto dosis-dependiente de la CHH-B1 recombinante sobre la capacidad osmorreguladora y la expresión de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa en camarones <i>Litopenaeus vannamei</i> sometidos a ablación bilateral del pedúnculo ocular
Revisión	pp 66-77	Extracción de compuestos fenólicos de subproductos agroindustriales por fermentación fúngica con uso potencial como aditivos para carne y productos cárnicos. Revisión
Original	pp 78-88	Efecto de levaduras de origen marino y ulvan en el control poscosecha de <i>Penicillium italicum</i> agente causal del moho azul en limón persa
Original	pp 89-100	Leptospirosis en la interfaz humano-animal-ambiente en América Latina: determinantes, medidas de prevención y control
Original	pp 101-108	Perfil de metabolitos y capacidad antioxidante de lechuga <i>Lactuca sativa</i> var. Longifolia en cultivo acuapónico irrigado con efluentes camaronícolas

- Original pp 109-116 Aislamiento y propiedades de colágeno extraído de una mezcla de subproductos de diferentes especies de pescado
- Original pp 117-124 Partición de proteína de lactosuero en un sistema de extracción acuosa en dos fases
- Original pp 125-132 Frutas tropicales y subproductos como fuente potencial de polisacáridos bioactivos
- Original pp 133-141 Recubrimiento comestible a base de alginato en combinación con eugenol nanoencapsulado y su efecto conservador en la vida útil de jitomate (*Solanum lycopersicum*)
- Original pp 142-150 Prevalencia de *Chlamydia abortus* en cabras con problemas de aborto en la zona centro de Sinaloa, México
- Original pp 151-157 Identificación molecular y evaluación de bacterias en el desarrollo vegetativo y producción de chile habanero
- Original pp 158-166 Remoción de negro de Eriocromo T de agua utilizando un material compuesto a base de quitosano/zeolita: un estudio cinético
- Original pp 167-174 Bacterias endófitas y su efecto en la inducción de resistencia sistémica en el cultivo de frijol contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*



Frequency, territorial distribution and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. on bovine cattle feces from the Altos Sur region of Jalisco State, Mexico

Frecuencia, distribución territorial y resistencia a los antimicrobianos de *Salmonella* spp. aislada de heces de ganado bovino de la región Altos Sur en el estado de Jalisco, México

Claudia Luz Navarro-Villarruel¹, Luz María Ibarra-Velázquez¹, Joel David Diosdado-Rojas¹, Ana Luisa Madriz-Elisondo¹, Marco Antonio Cardona-López¹, Juan José Varela-Hernández¹, Jesús Silva-Sánchez², Sofía María Arvizu-Medrano³ y J. Jesús Padilla-Frausto^{1*}

¹ Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara, Av. Universidad, No.1115, Col. Lindavista, Ocotlán, Jalisco, México, CP 47820.

² Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública. Av. Universidad No. 655, Cerrada Los Pinos y Caminera, Col. Santa María Ahuacatlán, Cuernavaca, Morelos, México, CP 62100.

³ Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Universitario s/n, Col. las Campanas, Querétaro, Querétaro, México, CP 76010.

ABSTRACT

Multidrug resistance is a global public health problem. In 2017, in Mexico, *Salmonella* caused 192,771 food-borne zoonosis cases. Sonora, Hidalgo, Mexico State and Jalisco have reports of multi-resistant *Salmonella* strains in chicken and beef carcasses in slaughterhouses; however, the prevalence in livestock herds is unknown. From January 2012 to October 2013, 144 diarrheal stool samples were collected from bovine hatchlings from the Altos Sur region of the Jalisco State. As a result, the presence and serotype of *Salmonella* was determined, as well as the antibiotic resistance profile, and the genetic relationship, using PFGE. The *Salmonella* prevalence was 4.16% (6/144) in feces, identifying the serotypes Anatum, Pullorum, Poona, Typhi, Gallinarum and *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*. All the strains showed resistance to ampicillin, cephalothin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and some of them, additionally, to amikacin, cefotaxime and/or ceftriaxone. In addition, the persistence and potential spread of two *Salmonella* Anatum strains was discovered in one herd. This is the first study conducted in neonate bovine in the Jalisco State, Mexico, to detect multidrug resistant *Salmonella*. Continuous monitoring of multi-drug resistance in animal biota for human food and ongoing training of veterinary doctors are key elements for efficient prophylaxis and antimicrobial pharmacotherapy.

Key Words: *Salmonella* spp.; Multidrug-resistance; Bovine cattle.

RESUMEN

La multifarmacorresistencia es un problema mundial de salud pública. En el 2017, en México, *Salmonella* causó 192,771 casos de zoonosis de origen alimentario. Sonora, Hidalgo, Estado de México y Jalisco tienen reportes de *Salmonella* multirresistente en canales de pollo y res en mataderos. Sin embargo, se desconoce la prevalencia en animales en hatos ganaderos. De enero-2012 a octubre-2013

se recolectaron 144 muestras de heces diarreicas de neonatos bovinos de la región Altos Sur del estado de Jalisco. Se determinaron los serotipos de *Salmonella*, el perfil de multifarmacorresistencia y el genotipo mediante PFGE. Se encontró una prevalencia del 4.16% (6/144) de *Salmonella* en heces, recuperándose los serotipos Anatum, Pullorum, Poona, Typhi, Gallinarum y *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*. Todas las cepas mostraron resistencia a ampicilina, cefalotina, trimetoprim-sulfametoxazol y adicionalmente algunas a amikacina, cefotaxima y/o ceftriaxona. Se descubrió una persistencia y propagación de dos cepas de *Salmonella* Anatum en un hato. Este es el primer estudio realizado en bovinos recién nacidos en el estado de Jalisco, México, para la detección de *Salmonella* multirresistente. Es necesario el monitoreo continuo de la multi-farmacorresistencia en la biota de animales para alimento humano y una capacitación continua de médicos veterinarios para una eficiente profilaxis y farmacoterapia antimicrobiana.

Palabras claves: *Salmonella* spp.; Multifarmacorresistencia; Ganado bovino.

INTRODUCTION

World beef production grew annually at an average rate of 0.6 percent during the recent decade, reaching a record high of 62.48 million tons of carcass meat in 2018 (United States Department of Agriculture; USDA, 2019). Mexico ranked as the eighth meat producer, with 3.2 percent of the total production (USDA, 2019). In Mexico, the Ministry of Agriculture and Rural Development, through the Agri-Food and Fisheries Information Service, reported a steady growth in beef production over the past decade, at an average annual rate of 1.7 percent, reaching a historical maximum of 1.98 million tons of carcass meat in 2018. Estimates indicate that in 2019 national production increased 2.4 percent, with what could be 2.03 million tons, while projections suggest that in 2020 it will only grow 1.9 percent (USDA, 2019). The

*Autor para correspondencia: J. Jesús Padilla Frausto
Correo electrónico: j.padilla@academicos.udg.mx

Recibido: 6 de septiembre de 2020
Aceptado: 16 de febrero de 2021

national consumption of bovine meat decreased at an annual average rate of 0.8 percent in the last decade, reaching 1.87 million tons in 2018. In 2019 this increase hit 2.02 million tons, which means the tendency is growing at an annual average rate of 0.43 percent, and it will reach 0.5 percent in 2020 (COMECARNE, 2019). Per capita consumption of beef in Mexico increased between 2015 and 2019, from 15.2 to 15.4 kilograms per year. Since 2015, Mexico recorded a surplus balance in the beef trade balance, which historically had been in deficit. In 2019, net exports of 273.5 thousand tons of beef were reported, the highest volume in the last five years, with an annual increase of 36.9 percent (COMECARNE, 2017; SADER, 2019; COMECARNE, 2019). According to USDA Foreign Agricultural Trade of the United States table, the surplus balance in the trade balance could increase 32.6 percent in 2021 (FATUS-USDA, 2020). The most purchased cuts are steak and milanese, followed by pulp, piece and ground meat (COMECARNE, 2019). Jalisco state is the second largest producer of bovine meat in Mexico, with 13.2 % of the 1,915 million tons of national production in 2019, and this amount represents the mobilization and slaughtering of approximately 280 thousand heads of cattle (SADER, 2019). The Jalisco regional livestock union, in its 2019 annual report noted that the northeast area of the state, which includes the Altos Norte and Altos Sur regions, participates with 46.4% of the state livestock production (UGRJ, 2019). Livestock production in the Altos Sur region maintained an increasing trend during the 2013-2018 period, with 2018 being the year with the highest growth in the value of livestock production in the region, representing 34.4% of the entire state production (IIEG, 2019). Among the livestock products for whose production the Altos del Sur region stands out, the egg is in first place with 47.4% of the total value of the region's production, followed by pork meat with 19.4 %, bovine milk with 17.2 %, bovine carcass meat with 11.3 % and poultry meat with 4.6 % (IIEG, 2019). In the region, from 2013 to 2019, the number of cattle herds producing beef cattle rose from 106 to 159 (IIEG, 2019).

Salmonella is the most important foodborne pathogenic bacteria worldwide. In Mexico, *Salmonella* is the most commonly reported bacterial pathogen in gastrointestinal infections, with 192,771 salmonellosis cases reported in 2019 to the National Center for Epidemiological Surveillance and Control of Diseases (Secretaría de Salud, 2017). Food producing animals are the main reservoir of non-typhoidal *Salmonella* (Elder *et al.*, 2000; Callaway *et al.*, 2008). These pathogens can originate from the animal's intestinal contents and hides in carcasses during harvesting and dressing process (Barkocy-Gallagher *et al.*, 2003).

The emergence of multidrug-resistant (MDR) *Salmonella* isolates among animals and humans has been documented, and represents a public health concern (Arthur *et al.*, 2008). Some reports have indicated that the use of antimicrobials in animal production for disease therapy, prophylaxis, and growth enhancement promotes the selection of resistant bacteria, although the impact of these uses on human health is not clearly understood yet (Mathew *et al.*,

2007; WHO, 2008). Resistance of pathogenic bacteria to antimicrobials used in human therapy may result in lower efficacy of these drugs against infections and may subsequently threaten public health (Geornaras *et al.*, 2012).

Guidelines for prudent use of antimicrobial agents may help to slow down the selection for resistance, and should be based on knowledge regarding the normal susceptibility patterns of the causative agents and consider the potential human health problems (Aarestrup, 2005). According to the World Health Organization (WHO, 2008), surveillance programs are needed to monitor the antimicrobial prevalence and resistance of *Salmonella* isolates from animals, humans, and food (Aidara-Kane *et al.*, 2018).

In Mexico, there are no surveillance reports of *Salmonella* strains with antimicrobial resistance in newborn cattle. It is necessary to generate monitoring programs for MDR *Salmonella* presence in the main livestock areas. These programs can be useful to develop public health policies for the regulation of drugs used in food-producing animals and to design control measures to prevent the spread of MDR bacteria (Whichard *et al.*, 2010). The purpose of this study was to determine the frequency, territorial distribution and antimicrobial resistance of *Salmonella* on cattle feces from the Altos Sur region of Jalisco State, Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Design of the investigation

This is a descriptive cross-sectional study to determine the frequency, territorial distribution and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp., on bovine cattle feces from the Altos Sur region in the Jalisco State, Mexico, during the period from January-2012 to October-2013.

Sample collection

A total of 144 diarrheal feces samples were collected from cattle from fourteen different herds, located in eleven of the twelve municipalities in the Altos Sur region of Jalisco State, Mexico, during a 21-month period (January-2012 to October-2013), on the condition that the cattle did not exceed four months of age. Samples were collected from at least one herd of cattle in each of the municipalities of the region; unfortunately, it was not possible to collect a sample from San Ignacio Cerro Gordo. Five grams of cattle diarrheal feces were collected in sterile bags (Speci-Sponge, Nasco Whirl-Pak, Modesto, CA) with 20 mL of buffered peptone water (BD, Franklin Lakes, NJ), thus fulfilling the procedure described by the U.S. Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS, 1996).

Salmonella isolation

Each sample was added to 40 mL of buffered peptone water for a total volume of 60 mL, homogenized for 2 min with a bag mixer (Stomacher® 80 Biomaster), and incubated at 35 °C for 18 to 22 h. After incubation, 1.0 and 0.1 mL aliquots were inoculated into 9 and 9.9 mL of tetrathionate broth (BD) and Rapaport-Vassiliadis broth (BD), respectively.

Both selective enrichment broths were incubated at 42 °C for 16 h. After incubation, 1.0 mL aliquots of each enrichment broth were individually transferred to tubes containing 10 mL of M broth (BD) and incubated at 35 °C for 6 to 8 h. After incubation, 0.5 mL aliquots of M broth culture from each tube were combined for an enzyme-linked immunosorbent assay (*Salmonella* VIA, TECRA International) (Hughes *et al.*, 2003) according to the manufacturer's instructions. Aliquots from tetrathionate and Rapaport-Vassiliadis cultures from samples that were positive for *Salmonella* with the enzyme-linked immunosorbent assay were individually streaked onto brilliant green sulfa agar (BD), bismuth sulfite agar (Bioxon), and xylose lysine Tergitol 4 agar (BD). All plates were incubated at 35 °C for 24 to 48 h. From each selective agar type, we selected and streaked at least three colonies with characteristics typical for *Salmonella*, onto triple sugar iron agar (BD) and lysine iron agar (BD) and incubated at 35 °C for 24 h. Isolates with typical biochemical reactions were then streaked onto Tryptic Soy agar (TSA; BD), incubated at 35 °C for 24 h, and tested for slide agglutination using polyvalent serum A-Vi (BD). Isolates that produced nontypical triple sugar iron agar and lysine iron agar reactions, and/or negative serological reactions, were tested for additional biochemical analysis in Methyl Red–Voges Proskauer medium, Simmons Citrate agar, Urease Rustigian and Stuart broth, motility medium, and Phenol Red Salicin and Dulcitol Fermentation broths (Bioxon) (USDA-FSIS, 2008). One isolate from each positive sample was randomly chosen for serotyping and antimicrobial susceptibility testing.

Serotyping

Salmonella cultures were reactivated in TSB at 35 °C for 24 h and then individually streaked on Brilliant Green Sulfa agar (BD) plates. From each culture, one colony with typical *Salmonella* characteristics was individually inoculated on TSA slants, incubated at 35 °C for 24 h, reconfirmed by biochemical and serological testing as previously described, and then shipped to the Institute of Epidemiological Diagnosis and Reference "Dr. Manuel Martínez Báez" (InDRE, Mexico City, Mexico) for serotype identification, according to the Kauffman-White scheme (1974).

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) for subtyping of *Salmonella* serotypes

Individual bacterial colonies of *Salmonella* strains, grown over 24 h at 37 °C on Trypticase Soy Agar (BD) plates were directly suspended using cotton swabs in 3 mL of TE buffer (100 mM Tris and 100 mM EDTA, pH 8.0). Cell suspensions were adjusted with TE buffer to 0.700 absorbance using a Varian Cary 50 Scan UV-visible spectrophotometer. Cell suspension aliquots (400 µL) were transferred to 1.5 mL microcentrifuge tubes. Lysozyme (10 mg/mL stock solution) and proteinase K (20 mg/mL stock solution) were added at a final concentration of 1 mg/mL each, and mixed several times by pipetting up and down. The bacterial suspensions were incubated at 37 °C for 15 min. UltraPure™ Agarose gel

(Invitrogen) was prepared in 0.5X TBE to a final concentration of 1 % and maintained at 55 °C in a water bath. Following the lysozyme-proteinase K incubation, 7 µL of 20 % sodium dodecyl sulfate and 140 µL of 1 % UltraPure™ Agarose gel (Invitrogen) were mixed with each bacterial suspension with the help of a pipette. This bacterium-agarose mixture was immediately added to plug molds (Bio-Rad Laboratories). The plugs were allowed to solidify for 10 min at 4 °C, then transferred to 2 mL round-bottom tubes containing 1.5 mL of TESP buffer (50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 9.0; 1 % sodium lauryl sarcosine; 1 mg of proteinase K per mL), and incubated with gentle mixing in a shaker water bath at 55 °C for 2 h. After the completion of proteolysis, the plugs were transferred to 1.5 mL microcentrifuge tubes containing 200 µL of sterile, preheated (50 °C) distilled water and incubated for 10 min at 50 °C with gentle mixing in a shaker water bath. Subsequently, four 50 °C washes were done in a shaker water bath for 15 min each with 400 µL of preheated (50 °C) TE buffer (10 mM Tris, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0), and plugs cooled to room temperature in TE buffer. For restriction endonuclease digestion, two 1 mm thick slices of each plug were incubated at 37 °C for 3 h with 3 µL of *Xba*I (Invitrogen), in 100 µL of the restriction enzyme buffer (containing 4 µL of restriction enzyme buffer (10x), 0.1 % BSA and 29 µL of sterile DNase/RNase-Free Distilled Water) as recommended by the manufacturer.

The plug slices of the samples were loaded and electrophoresed in 1 % UltraPure™ agarose (Invitrogen) with 2 liters of standard 0.5X TBE running buffer. Electrophoresis of the prepared samples was performed on the CHEF-DR III system (Bio-Rad). The electrophoretic conditions used were as follows: initial switch time, 2.16 s; final switch time, 55 s; run time, 22 h; angle, 120 °; gradient, 6.0 V/cm; temperature, 14 °C; ramping factor, linear. After electrophoresis, the gels were stained for 30 min in 1 liter of sterile distilled water containing 50 mL of ethidium bromide (10 mg/mL) and destained with three 1-liter distilled water washes (30 min each); then, photographed under UV illumination with Kodak film (Edas 290) in 8-bit negative format in gray scale. Additional analysis and construction of dendrograms and trees were done with GelCompar II software (version 2.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). The molecular size marker (*Xba*I-digested DNA from *S. enterica* serotype Braenderup H9812) was included in all runs as a control. The consistency of the control DNA patterns confirmed the reproducibility of the procedure.

Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility was determined according to the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar as described by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009; CLSI, 2010). Antimicrobial susceptibility test disks (BBL, BD, Sparks, MD) were used for the following antimicrobials of veterinary and human health importance: ampicillin (AMP, 10 µg), gentamicin (GEN, 10 µg), amikacin (AN, 30 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT, 1.25 and 23.75 µg), ceftriaxone (CRO, 30 µg), cefotaxime (CTX, 30 µg), polymyxin

B (PB, 300 units) and cephalothin (CEP, 30 µg). *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as a quality control. Inhibition zones were measured as MIC breakpoints according to the M100-S20, (CLSI, 2010). Multidrug resistance was reported when resistance to three or more antimicrobials was observed (Miranda *et al.*, 2009). It is worth mentioning that the antibiotics selection was made according to the therapeutic recommendation against suspected gastrointestinal diseases caused by resistant and non-resistant *Salmonella* (CDC, 2009).

Complementary study

Additionally, in October 2013 and January 2017, a survey was conducted to evaluate the sale frequency of the different groups of antibiotics in veterinary pharmacies of the region, with the aim of explaining the possible resistance of isolated *Salmonella* strains. Thirty-six veterinary pharmacies were included in this study. The number of sold vials of each antibiotics group in the last two months was recorded, as an indicator of the pharmacological preferences of the region's veterinary doctors or livestock farmers.

Data analysis

The differences significance ($p \leq 0.05$) in *Salmonella* isolation frequency by cattle farm were evaluated with the Kruskal-Wallis test and the Fisher's LSD test and the preference for the best-selling antimicrobials in the region's veterinary pharmacies were evaluated with the chi-square test in the Statistical Package for Social Science, version 11.5 for Windows (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Table 1. Frequency of *Salmonella* serotypes in cattle feces from the Altos Sur region in Jalisco State, Mexico (Jan-2012 to Oct-2013).

Tabla 1. Frecuencia de los serotipos de *Salmonella* en heces de ganado de la región de Altos Sur en el estado de Jalisco, México (ene-2012 a oct-2013).

Municipalities	Cattle herd	No. of stool samples of cattle feces per herd	No. of <i>Salmonella</i> spp. positive samples (Percentage with respect to the total samples analyzed per herd,%) ¹ /No. of strains isolated	<i>Salmonella</i> serotype isolate and another subsp. (No. of strains isolated)
Mexxicacán	A	13	2 (15.38) ^b /2	Pullorum(1) <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (1)
	B	9	0 ^c	-
San Julián	C	3	0 ^c	-
Capilla de Guadalupe	D	4	0 ^c	-
Jesús María	E	13	0 ^c	-
Valle de Guadalupe	F	6	0 ^c	-
Jalostotitlán	G	7	0 ^c	-
San Miguel El Alto	H	16	0 ^c	-
Tepatitlán de Morelos	I	24	0 ^c	-
	J	10	1 (10.00) ^b /1	Gallinarum(1)
Yahualica de González Gallo	K	14	2 (14.29) ^b /3	Anatum(2) Typhi(1)
Arandas	L	18	0 ^c	-
	M	6	0 ^c	-
Cañadas de Obregón	N	1	1 (100) ^a /1	Poona(1)
Total		144	6 (4.16) /7	

¹ Within these columns, values with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$) by Kruskal-Wallis test and Fisher's LSD test.

Frequency and territorial distribution of *Salmonella* in cattle

Salmonella spp. was isolated from 6 (4.16 %) of 144 diarrheal feces samples of bovine neonates of exploitation, collected from eleven municipalities from the Altos Sur region in Jalisco State, Mexico (Table 1). The isolated *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotypes were Anatum, Pullorum, Poona, Typhi and Gallinarum, and a sample contained *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*. *Salmonella* was isolated in bovine diarrheal stool samples from four of the eleven municipalities that were included in the study (Figure 1).

Antimicrobial susceptibility and PFGE patterns of *Salmonella* serotypes

Seven *Salmonella* strains were characterized to determine their antimicrobial susceptibility and PFGE patterns (Figure 2). The antimicrobial resistance criterion is represented by gray scale boxes. Five antibiograms were identified. All *Salmonella* strains have resistance to AMP, CEP and STX. The *Salmonella* Anatum, Typhi and Gallinarum serotype strains additionally showed resistance to AN, CTX and/or CRO. The *Salmonella* Anatum strains identified as 15A44 (obtained in July 2012) and 21A52 (January 2013) showed a similar susceptibility pattern, and these strains were identified by PFGE as clones.

Sale frequency of the different antibiotic groups in veterinary pharmacies of the region

Table 2 shows the trends for the antibiotics demand in veterinary pharmacies of the region in 2013, and the changes in preferences after an equal evaluation four years later.

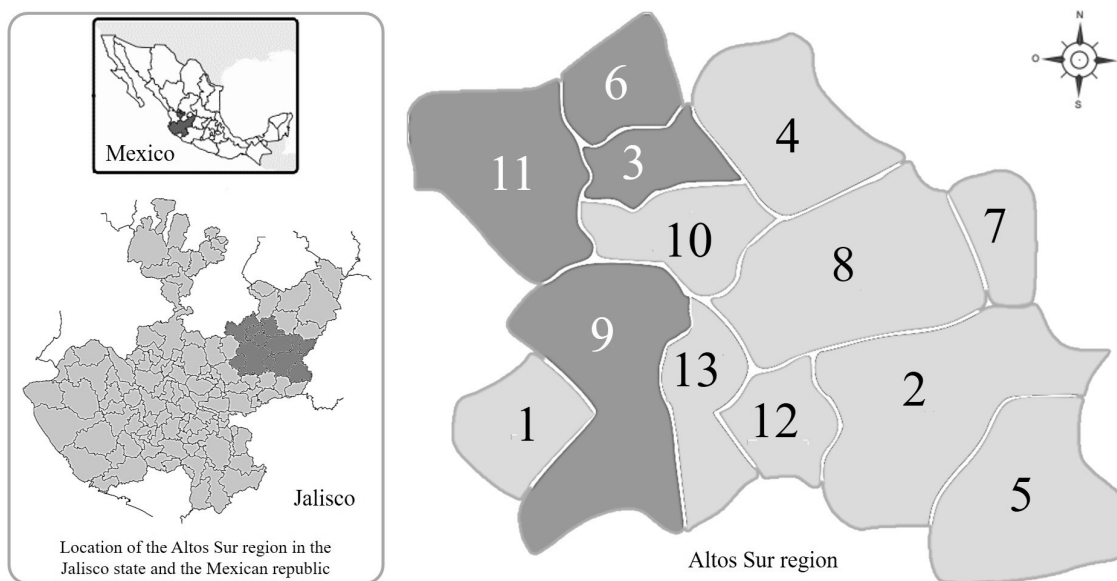


Figure 1. Territorial distribution of samples positive for *Salmonella* in the Altos Sur region in Jalisco. 1. Acatic, 2. Arandas, 3. Cañadas de Obregón, 4. Jalostotitlán, 5. Jesús María, 6. Mexxicacán, 7. San Julián, 8. San Miguel el Alto, 9. Tepatitlán de Morelos, 10. Valle de Guadalupe, 11. Yahualica de González Gallo and 12. San Ignacio Cerro Gordo (not included in the study).
Figura 1. Distribución territorial de las muestras positivas para *Salmonella*, en los Altos Sur de Jalisco. 1. Acatic, 2. Arandas, 3. Cañadas de Obregón, 4. Jalostotitlán, 5. Jesús María, 6. Mexxicacán, 7. San Julián, 8. San Miguel el Alto, 9. Tepatitlán de Morelos, 10. Valle de Guadalupe, 11. Yahualica de González Gallo y 12. San Ignacio Cerro Gordo (municipio no incluido en este estudio).

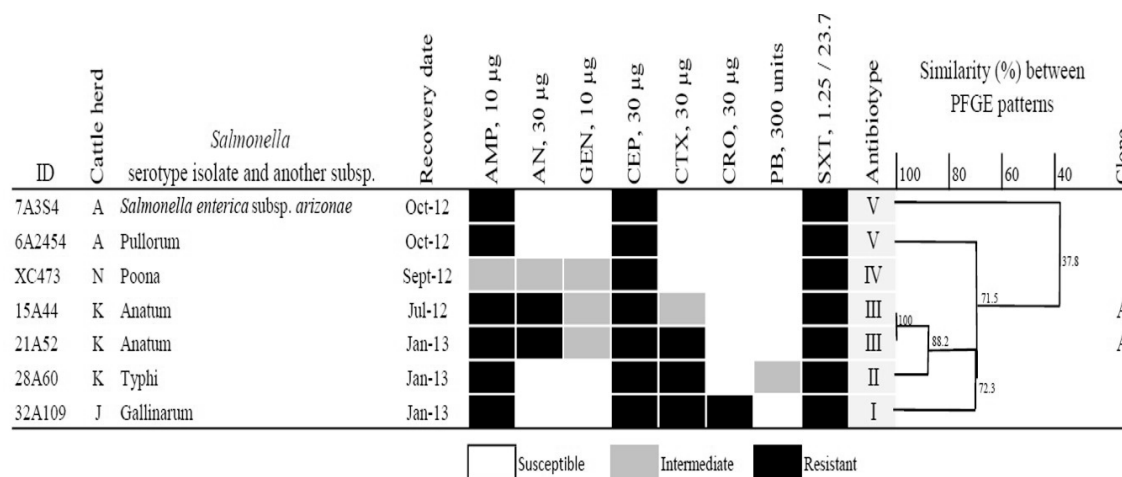


Figure 2. Antimicrobial susceptibility patterns and PFGE of *Salmonella* serotypes. AMP: Ampicillin, AN: Amikacin, GEN: Gentamicin, CEP: Cephalothin, CTX: Cefotaxime, CRO: Ceftriazone, PB: Polymyxin B and, SXT: Trimethoprim-Sulfamethoxazole.
Figura 2. Patrones susceptibilidad a antimicrobianos y PFGE de los serotipos de *Salmonella*. AMP: Ampicilina, AN: Amikacina, GEN: Gentamicina, CEP: Cefalotina, CTX: Cefotaxima, CRO: Ceftriazona, PB: Polimixina B y, SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol.

Based on observations, the most requested chemical groups in veterinary pharmacies are aminopenicillins, sulfonamides (with and without dihydrofolate reductase inhibitors), penicillins, cephalosporins and first, third and fourth-generation fluoroquinolones. The 2014 results were reported to the Commission for the Protection against Sanitary Risks of the State of Jalisco (COPRISJAL), which in 2015, with the support of the College of Veterinary Doctors of the State of Jalisco (Civil Association), started an awareness and training campaign on the public health impact of multi-drug resistant

pathogens, the use of antibiotics in livestock feed and antimicrobial therapeutic alternatives for farm cattle. In early 2017, the veterinary pharmacies survey in the Altos Sur region of Jalisco was repeated to observe changes in the trend of the veterinary doctors' preferences for the different antimicrobial drugs. The results of the survey indicate that the demand for aminopenicillins and sulfonamides (with and without dihydrofolate reductase inhibitors) has increased. These are the antimicrobial drugs recommended by the FDA National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS, 2010)

Table 2. Changes in the antimicrobials dispensing preference in veterinary pharmacies at the Altos Sur region of Jalisco State, Mexico.
Tabla 2. Cambios en la preferencia de dispensación de antimicrobianos en farmacias veterinarias en la región de Altos Sur del estado de Jalisco, México.

Class of drugs	Antibiotics	Number of veterinary pharmacies ¹ (Relative frequency) ²		Change in acquisition preference ³
		October 2013	January 2017	
Aminoglycoside	Amikacin ^b	2(5.6 %)	2(5.6 %)	Without changes
Aminoglycoside	Gentamicin ^b	3(8.3 %)	3(8.3 %)	Without changes
Aminopenicillins	Ampicillin ^a	15(41.7 %)	18(50.0 %)	Increase
Beta-lactam	Penicillin G ^a	8(22.2 %)	7(19.4 %)	Reduction
Beta-lactam	Oxacillin ^a	1(2.8 %)	0(0 %)	Reduction
Beta-lactam/beta-lactamase inhibitors	Amoxicillin with clavulanic acid ^a	5(13.9 %)	8(22.2 %)	Increase
Cephalosporin (First-generation)	Cephalothin ^{a,b,d}	8(22.2 %)	5(13.9 %)	Reduction
Cephalosporin (Third-generation)	Ceftriaxone ^{a,b,d}	7(19.4 %)	5(13.9 %)	Reduction
Cephalosporin (Third-generation)	Cefotaxime ^{a,b,d}	4(11.1 %)	1(2.8 %)	Reduction
Cephalosporin (Fourth-generation aminothiazolyl)	Cefquinome ^{e,f,g}	2(5.6 %)	3(8.3 %)	Increase
Cephalosporin (Fourth-generation)	Cefepime ^{a,b,d}	9(25.0 %)	4(11.1 %)	Reduction
Cyclic non-ribosomal polypeptide	Polymyxin B ^b	2(5.6 %)	1(2.8 %)	Reduction
Fluoroquinolone	Ciprofloxacin ^e	1(2.8 %)	1(2.8 %)	Without changes
Fluoroquinolone	Danofloxacin ^e	7(19.4 %)	9(25.0 %)	Increase
Sulfonamide	Sulfadiazine ^{a,e}	14(38.9 %)	19(52.8 %)	Increase
Sulfonamide/inhibitor of dihydrofolate reductase	Trimethoprim-Sulfamethoxazole ^{a,b,e,f}	17(47.2 %)	18(50.0 %)	Increase
Tetracycline	Oxytetracycline ^c	1(2.8 %)	1(2.8 %)	Without changes
Tetracycline	Minocycline ^b	2(5.6 %)	0(0 %)	Reduction
Tetracycline	Doxycycline ^b	0(0 %)	3(8.3 %)	Increase

¹ Number of veterinary pharmacies that reported it as one of the three best-selling antibiotics of 36 veterinary outlets surveyed. ² (No. of veterinary pharmacies that reported it as one of the three best-selling antibiotics/36 veterinary outlets surveyed) x 100. ³ Changes with statistical significance ($p \leq 0.05$).

^aFor wounds treatment

^bFor gastrointestinal infections treatment

^cIn livestock feed to prevent diseases and infections in cattle

^dIs contraindicated in neonates cattle

^eFor respiratory disease treatment

^fFor mastitis treatment in dairy cattle

^gIt is only used in veterinary applications

for veterinary use in wounds, mastitis, gastrointestinal and respiratory infection treatments. In contrast, there was a reduction in the demand of first and third-generation cephalosporins, while the consumption of cefquinome raised, which is a fourth-generation cephalosporin recommended exclusively for veterinary use.

DISCUSSION

As an infectious, contagious pathogen, *Salmonella* is probably rivaled just by bovine viral diarrhea virus in its ability to cause clinical diseases, such as enteritis, septicemia, pneumonia, and reproductive losses (Holschbach and Peek, 2018). The increasing prevalence of *Salmonella* presents new challenges to meat producers and veterinarians. No current discussion on bovine salmonellosis is complete without acknowledging the increasing public health concern. Increasing antimicrobial resistance among enteric pathogens brings the use of antimicrobials by veterinarians and producers under an increasingly strict scrutiny. There are no studies

in Mexico on this pathogen prevalence in newborn cattle. However, the presence of the pathogen can be assumed as a commensal biota in their intestine, which will accompany them during their life to the slaughterhouse. Hence, it can be also assumed that the contamination of the carcass can be configured, if hygienic practices are not maintained in the gutted during the slaughter. In this respect, there are studies on the prevalence of this pathogen in slaughterhouse meat that report the contamination of the carcass.

In Mexico, Narvaez *et al.*, (2013) and Pérez-Montano *et al.*, (2012) reported information related to the presence of *Salmonella* on beef carcasses in abattoirs and cattle feedlots, indicating a *Salmonella* presence of 5.2 % and 55.56 %, respectively. They also reported that all abattoirs included in her study had failed to comply with good manufacturing practices (GMPs) and sanitation standard operating procedures (SSOPs), and none had implemented a food safety system. Fecal contamination on beef carcasses was visible and cross-contamination was common during operations

at all abattoirs. Without excluding GMPs and SSOPs during rearing, dressing and slaughter, it is important to evaluate and control the presence of *Salmonella* and other pathogens in farm cattle at the different stages of their life (neonate, reproductive age and prior to slaughter). In addition to this, Barkocy-Gallagher *et al.* (2003) reported that *Salmonella* prevalence on pre-eviscerated beef carcasses was higher during summer and fall (19.7 to 24.9 %) than in winter and spring (3.0 to 4.1 %). During the wet season, cattle hides are more likely to be soiled with mud and feces, increasing the possibility of carcass contamination during hide removal and evisceration (Rivera-Betancourt *et al.*, 2004). It is worth mentioning that the mere presence of the pathogen in the intestine of the animal of origin and, unfortunately, in its carcass, does not necessarily have an impact on the consumer's disease, cross contamination with other raw or cooked foods must occur and/or an inadequate thermal elimination of the pathogen in the food of meat origin. However, all the *Salmonella* serotypes and *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* that were isolated in this study have been previously related, as ethological agents, to disease outbreaks due to poorly cooked meats intake (Geimba *et al.*, 2004; Gould *et al.*, 2004; Duggan *et al.*, 2012; Evangelopoulou *et al.*, 2014).

Regarding geographical distribution, the municipalities that present cattle carrying *Salmonella* make up the western area of the region, connected by federal highways 71 and 207. Here, six of the fourteen studied cattle ranches are located, and is the only land route by which feed and supplies for the livestock feeding are distributed, as well as the products of its exploitation. Therefore, it will be necessary to evaluate if there is any source or mechanism of *Salmonella* contamination in the bovine feeding sources in this area of the region and in the particular practices of antimicrobial treatment and prophylaxis of veterinary doctors who take care of livestock in the area.

All of the above results because of the process of animal food production, which involves large amounts of antimicrobial agents either for therapy, metaphylactic, prophylaxis of bacterial infections or, in feed, to promote growth (Van Broeckel *et al.*, 2015). Globally, intensive livestock farming has increased food production at a low cost per unit, but perhaps at the unrecognized price of increased antimicrobial resistance (FDA, 2010a).

Linking antimicrobial consumption in animals to drug-resistant infections in humans is inherently complex, due to the ecological nature of selection pressure for drug-resistant pathogens, as well as to the existence of indirect routes of transmission through the environment (Roca *et al.*, 2015).

In the United States, the use of antimicrobial for animal feeding is estimated to account for 80% of the nation's annual antimicrobial consumption (FDA, 2010b). A significant fraction of this, involves antimicrobials that are important for the treatment of common human infections, and for performing medical procedures such as major surgeries, organ transplantation, and chemotherapy (Laxminarayan *et al.*, 2013). Modern animal production practices are associated

with the regular use of antimicrobials, potentially increasing selection pressure on bacteria to become resistant (Van Boeckel *et al.*, 2015).

Van Boeckel *et al.* (2015) report that in 2010, the five countries with the largest shares of global antimicrobial use for animal food production were China (23 %), the United States (13 %), Brazil (9 %), India (3 %), and Germany (3 %). However, by 2030, this ranking is projected to be China (30 %), the United States (10 %), Brazil (8 %), India (4 %), and Mexico (2 %). With this trend and without particular actions for its containment, the problem of drug multiresistance will increase. In Mexico, particularly in the Sonora, Hidalgo, Jalisco and State of Mexico, studies have shown the presence of multidrug-resistant *Salmonella* in chicken and beef carcasses and cooked foods (Miranda *et al.*, 2009; Pérez-Montaña *et al.*, 2009; Camacho *et al.*, 2010; Gordillo-Benavente, 2019). It is worth mentioning that all the *Salmonella* strains isolated from neonatal cattle from the Altos Sur region of the state of Jalisco show multiresistance to drugs, according to the criteria of Miranda *et al.* (2009). Particularly, the strains show resistance to drugs (AMP, CEP, STX, AN, CTX and CRO) that belong to the chemical groups of greater use in human and veterinary antibiotherapy. In addition, it is striking those two samples of diarrheal feces from the same cattle herd belonged to the same *Salmonella* Anatum clone. The two samples were recovered from different calves, on different sampling dates (July 2012 and January 2013), which indicates an operating source of contamination in the cattle herd. Likewise, between strain 15A44 (from July 2012) and strain 21A52 (from January 2013), an increase of resistance to CTX (transition from and intermediate category to a resistant one) was observed, even though the use of CTX is contraindicated in newborn cattle.

Finally, the high demand for aminopenicillins, sulfonamides (with and without dihydrofolate reductase inhibitors), penicillins, first, third and fourth-generation cephalosporins and fluoroquinolones might relate to the multidrug resistance shown by *Salmonella* strains in diarrheal feces of newborn cattle. Although the awareness campaign offered to veterinary doctors was useful to modify the consumption preferences of veterinary drugs in favor of those recommended by the FDA (FDA, 2010b), we also recommend to raise awareness among farm livestock producers, to limit the spread of multi-resistant strains and the consumption of feed prepared with antibiotics for prophylactic or growth improvement purposes. We recommend reducing the prophylactic use of antimicrobials, eliminating the use of antimicrobial agents as development promoters and making the choice of antimicrobials more efficient, selecting alternatives for exclusive veterinary use.

CONCLUSIONS

In conclusion, this study is, as far as we know, the first study conducted in neonate bovine in the Jalisco State, Mexico, for detecting multidrug resistant *Salmonella*. Our findings call for initiatives to preserve antibiotic effectiveness while

ensuring food security in low and middle-income countries, as ours. Information on the occurrence of resistance is crucial at local, regional and international levels to guide policy and detect changes that require a response strategy. In order to fulfil this requirement, we need systems for the continuous monitoring on the changes in the occurrence of resistance.

CONFLICT OF INTEREST:

Authors declare that they have no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We, the authors, would like to thank the livestock producers and managers for their permission to collect, for scientific research purposes, fecal samples from the cattle housed on their farms. We also thank the National Council of Science and Technology of Mexico for the scholarship granted to Joel David Diosdado Rojas.

REFERENCES

- Aarestrup, F.M. 2005. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 96(4): 271-281.
- Aidara-Kane, A., Angulo, F.J., Conly, J.M., Minato, Y., Silbergeld, E.K., McEwen, S.A., & Collignon, P.J. 2018. World Health Organization (WHO) guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 7(1): 7.
- Arthur, T.M., Kalchayanand, N., Bosilevac, J.M., Brichta-Harhay, D.M., Shackelford, S.D., Bono, J.L., Wheeler, T.L. & Koohmaraie, M. 2008. Comparison of effects of antimicrobial interventions on multidrug-resistant *Salmonella*, susceptible *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of food protection*, 71(11): 2177-2181.
- Barkocy-Gallagher, G.A., Arthur, T.M., Rivera-Betancourt, M., Nou, X., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., & Koohmaraie, M. 2003. Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157: H7 and non-O157 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. *Journal of food protection*, 66(11): 1978-1986.
- Callaway, T.R., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Byrd, J.A. & Nisbet, D.J. 2008. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. *Journal of Animal Science*. 86:E163-E172.
- Camacho, R.O., Acedo, R.L.E., Moreno, I.G.M., Sánchez, M.R.I., Castellón, C.L.G. & Navarro, N.M. 2010. Detección de *Salmonella* resistente a los antibióticos en vísceras de pollo. *Biotecnia*. XII: 3-11.
- CDC, 2009. Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). Available at: <https://www.cdc.gov/salmonella/general/technical.html>. Accessed July 2013.
- CLSI. 2009. M2-A10. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. 10th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. (Updated standard available at: www.clsi.org.) Wayne, Pennsylvania. USA.
- CLSI. 2010. M100-S20. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania. USA. Available at: <https://www.techstreet.com/mss/products/preview/1662926>. Accessed March 2013.
- COMECARNE. 2017. Consejo Mexicano de la Carne, con datos del INEGI. Compendio estadístico 2017 de la industria cárnica mexicana. Available at: <http://comecarne.org/wp-content/uploads/2018/05/Compendio-Estad%C3%ADstico-2017-v7-1-sin-elab.pdf>. Accessed November 2018.
- COMECARNE. 2019. Consejo Mexicano de la Carne, con datos del INEGI. Compendio estadístico 2019 de la industria cárnica mexicana. Available at: https://comecarne.org/wp-content/uploads/2020/05/Compendio_Estadistico_2019.pdf. Accessed Mayo 2021.
- Duggan, S., Jordan, E., Gutierrez, M., Barrett, G., O'Brien, T., Hand, D. & Egan, J. 2012. *Salmonella* in meats, water, fruit and vegetables as disclosed from testing undertaken by Food Business Operators in Ireland from 2005 to 2009. *Irish veterinary journal*, 65(1): 17.
- Elder, R.O., Keen, J.E., Siragusa, G.R., Barkocy-Gallagher, G.A., Koohmaraie, M., & Laegreid, W.W. 2000. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(7): 2999-3003.
- Evangelopoulou, G., Kritas, S., Govaris, A., & Burriel, A.R. 2014. Pork meat as a potential source of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* infection in humans. *Journal of clinical microbiology*, 52(3): 741-744.
- FAOSTAT. 2017. FAOSTAT México. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/CL>. Accessed November 2018.
- FATUS-USDA. 2020. USDA Foreign Agricultural Trade of the United States. Economic Research Service. U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Available at: <https://www.ers.usda.gov/data-products/foreign-agricultural-trade-of-the-united-states-fatus/us-agricultural-trade-data-update/> Accessed Mayo 2021.
- FDA. (2010a). Food and Drug Administration. Guidance for Industry-Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: General Approach to Establish a Microbiological ADI VICH GL36(R) Available at <https://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM124674.pdf> . Accessed November, 2018.
- FDA. (2010b). Food and Drug Administration. *CVM Updates - CVM Reports on Antimicrobials Sold or Distributed for Food-Producing Animals* (Food Drug Admin, Silver Spring, MD). Available at www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm236143.htm. Accessed March 2015.
- Geimba, M.P., Tondo, E.C., de Oliveira, F.A., Canal, C.W., & Brandelli, A. 2004. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. *Journal of food protection*. 67(6): 1229-1233.
- Geornaras, I., Yang, H., Moschonas, G., Nunnally, M.C., Belk, K.E., Nightingale, K.K., & Sofos, J.N. 2012. Efficacy of chemical interventions against *Escherichia coli* O157: H7 and multidrug-resistant and antibiotic-susceptible *Salmonella* at inoculated beef trimmings. *Journal of food protection*.

- 75(11): 1960-1967.
- Gordillo Benavente, M.A. 2019. Prevalencia de *Salmonella* spp. en alimentos contaminados y descripción según serotipos; tipos de alimentos y jurisdicciones sanitarias afectadas en Chiapas, durante el periodo 2016-2018 (Doctoral dissertation, Facultad en Ciencias Odontológicas y Salud Pública-Maestría en Ciencias en Salud Pública-UNICACH). México State, México.
- Gould, D., Kraa, E., Dalton, C. B., Givney, R., Gregory, J., Stafford, R.J., & Kirk, M.D. 2004. Foodborne disease outbreaks in Australia, 1995 to 2000. Communicable diseases intelligence quarterly report: 28(2): 211.
- Holschbach, C.L., & Peek, S.F. 2018. *Salmonella* in dairy cattle. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 34: 133-154.
- Hughes, D., Dailianis, A.E., Hill, L., Curiale, M.S. & Gangar, V. 2003. *Salmonella* in foods: new enrichment procedure for TECRA *Salmonella* visual immunoassay using a single rv(R10) only, TT only, or dual rv(R10) and TT selective enrichment broths (AOAC official method 998.09): collaborative study. J. AOAC Int. 86: 775-790.
- IIEG. 2019. Instituto de Información Estadística y Geográfica del Estado de Jalisco. Diagnóstico de la región Altos Sur Agosto 2019. Available at: <https://iieg.gob.mx/ns/wp-content/uploads/2019/12/03-Altos-Sur-Diagn%C3%B3stico-1.pdf> . Accessed July 2020.
- Kauffman, G. 1974. "Kauffman White Scheme. WHO. Pd 172, 1, rev. 1,"Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section B-Microbiology. 61: 385.
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A.K., Wertheim, H.F., Sumpradit, N. & Greko, C. 2013. Antibiotic resistance—the need for global solutions. The Lancet infectious diseases. 13(12): 1057-1098.
- Mathew, A.G., Cissell, R., & Liamthong, S. 2007. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. Foodborne pathogens and disease. 4(2): 115-133.
- Miranda, J.M., Mondragón, A.C., Martínez, B., Guarddon, M., & Rodríguez, J.A. 2009. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. Journal of food protection. 72(5): 966-971.
- Narvaez-Bravo, C., Miller, M.F., Jackson, T., Jackson, S., Rodas-Gonzalez, A., Pond, K., & Brashears, M.M. 2013. *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7 prevalence in cattle and on carcasses in a vertically integrated feedlot and harvest plant in Mexico. Journal of food protection. 76(5): 786-795.
- NARMS. 2010. National Antimicrobial Resistance Monitoring System. Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/media/82822/download>. Accessed March 2013.
- Pérez-Montano, J.A., Gonzalez-Aguilar, D., Barba, J., Pacheco-Gallardo, C., Campos-Bravo, C. A., Garcia, S., ... & Cabrera-Díaz, E. 2012. Frequency and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes on beef carcasses at small abattoirs in Jalisco State, Mexico. Journal of food protection. 75(5): 867-873.
- Rivera-Betancourt, M., Shackelford, S.D., Arthur, T.M., Westmoreland, K.E., Bellingier, G., Rossman, M., ... & Koohmaraie, M. 2004. Prevalence of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. Journal of food protection. 67(2): 295-302.
- Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S., ... & Kahlmeter, G. 2015. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. New microbes and new infections. 6: 22-29.
- SADER. 2019. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Producción de carne de bovino en el 2019. Comunicado del 16 de marzo de 2020. Available at: <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/la-produccion-de-carne-de-res-en-mexico-mantiene-un-crecimiento-anual-sostenible-del-2-5-agricultura?idiom=es> Accessed May 2020.
- Secretaría de Salud. 2017. Anuarios Estadísticos de Morbilidad-Datos abiertos. Dirección General de Epidemiología - Dirección General Adjunta de Epidemiología. Available at: <https://www.gob.mx/salud/documentos/datos-abiertos-152127>. Accessed November 2018.
- UGRJ. 2019. Unión Ganadera Regional de Jalisco. Informe de actividades 2018. Available at: http://www.ugrj.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=138&Itemid=228. Accessed May 2019.
- USDA-FSIS. 1996. U.S. Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. Pathogen reduction; Hazard analysis and critical control point (HACCP) systems; final rule. 9 CFR, Part 304. Available at: <http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/93-016F.pdf> . Accessed July 2018.
- USDA-FSIS. 2008. U.S. Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. Isolation and identification of *Salmonella* from meat, poultry and eggs products. MLG 4.04. Laboratory QA/QC Division, Athens, GA.
- USDA. 2019. U.S. Department of Agriculture Mexico livestock and products annual. August 2019. Available at: <https://www.fas.usda.gov/data/mexico-livestock-and-products-annual-6>. Accessed July 2020.
- Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., ... & Laxminarayan, R. 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. Proceedings of the National Academy of Sciences. 112(18): 5649-5654.
- Whichard, J.M., Medalla, F., Hoekstra, R.M., McDERMOTT, P.F., Joyce, K., Chiller, T., ... & White, D.G. 2010. Evaluation of antimicrobial resistance phenotypes for predicting multidrug-resistant *Salmonella* recovered from retail meats and humans in the United States. Journal of food protection. 73(3): 445-451.
- WHO. 2008. World Health Organization. Antimicrobial resistance from food animals. Information note 2/2008. Antimicrobial resistance. International Food Safety Authorities Network. Available at: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_02_Antimicrobial_Mar08_EN.pdf . Accessed November 2018.

Crecimiento, acumulación y distribución de materia seca en dos variedades de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* y *A. cruentus*) bajo fertirrigación

Growth, accumulation and distribution of dry matter in two varieties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L. y *A. cruentus* L.) under fertigation

Diego Monroy-Pedroza¹, José de Jesús Martínez-Hernández¹, Francisco Gavi-Reyes², Margarita Torres-Aquino^{1*}, Ismael Hernández-Ríos¹

¹ Posgrado Innovación en Manejo de Recursos Naturales, Colegio de Postgraduados, Campus San Luis Potosí. Iturbide No. 73, Colonia Centro. Salinas de Hidalgo, CP 78620, San Luis Potosí, México.

² Postgrado en Hidrociencias, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco. CP 56230, Montecillo, Edo. de México, México.

ABSTRACT

Amaranth is a crop adapted to arid and semi-arid agroclimatic conditions. Its grain yield can be increased with fertigation, but there is limited information on growth parameters and crop yield under this system. The objective of this work was to characterize growth, accumulation and distribution of biomass of two varieties of amaranth (Froncosa and Dorada) with fertigation. The experimental phase was carried out in Salinas, San Luis Potosí, at a density of 25 plants per m². Organomineral fertilization was applied to soil, and chemical fertilization through irrigation, whose total water sheet was 321 mm. Froncosa compared to Dorada, reached faster maturity and presented higher values of: leaves number, panicle length and dry biomass, as well as harvest index (gain/total dry biomass). Thermal requirement was 910.7 °C and 968.6 °C for Froncosa and Dorada, respectively. Froncosa had higher water use efficiency (WUE) (7.1 kg mm⁻¹) in grain production (2.3 t ha⁻¹), but WUE for fresh biomass (69.6 t ha⁻¹) was higher in Dorada (216.6 kg mm⁻¹). Environmental conditions in Altiplano Potosino are favorable to produce amaranth with high yield (grain or forage) under fertigation.

Keywords: *Amaranthus* spp, growth dynamics, yield components, fertigation, water use efficiency

RESUMEN

El cultivo de amaranto se adapta a condiciones agroclimáticas de regiones áridas y semiáridas. Su rendimiento de grano puede incrementarse con fertirriego, pero es necesario generar más información sobre parámetros de crecimiento y rendimiento del cultivo bajo este sistema. El objetivo fue caracterizar el crecimiento, acumulación y distribución de materia seca de dos variedades de amaranto (Froncosa y Dorada) bajo fertirrigación. La fase de campo se realizó en Salinas, San Luis Potosí, con una densidad de 25 plantas por m². Se aplicó fertilizante organomineral al suelo y nutrición química en el agua de riego, cuya lámina total fue 321 mm. Froncosa, respecto a la Dorada, llegó más rápido a madurez y mostró valores mayores en: número de hojas; longitud y biomasa seca de panoja; e índice de cosecha (grano/biomasa total).

El requerimiento térmico total fue de 910.7 °C y 968.6 °C para Froncosa y Dorada, respectivamente. Froncosa tuvo mayor eficiencia en el uso del agua (EUA) (7.1 kg mm⁻¹) en grano (2.3 t ha⁻¹), pero la EUA para biomasa fresca (69.6 t ha⁻¹) fue mayor en Dorada (216.6 kg mm⁻¹). Las condiciones ambientales del Altiplano Potosino son favorables para producir Amaranto con alto rendimiento de grano o forraje con fertirrigación.

Palabras clave: *Amaranthus* spp, dinámica de crecimiento, componentes de rendimiento, fertirrigación, eficiencia de uso de agua

INTRODUCCIÓN

El género *Amaranthus* L. pertenece a la familia Amaranthaceae e incluye cerca de 75 especies, el 44% de las cuales son originarias de América y el resto de Australia, África, Asia y Europa (Costea *et al.*, 2001). Algunas especies de este género son malezas; por ejemplo, *A. spinosus*, *A. tuberculatus* y *A. retroflexus*; mientras que las especies, *A. hypochondriacus*, *A. caudatus* y *A. cruentus* tienen un interés agronómico, ya que su grano supera nutrimentalmente al de maíz, arroz y trigo (Paredes-López *et al.*, 2006; Maurya y Arya, 2018). *A. hypochondriacus* y *A. caudatus* son utilizadas con doble propósito (grano y forraje), *A. blitum*, *A. dubius* y *A. tricolor* se aprovechan como verdura por sus propiedades nutrimentales similares a la espinaca (*Spinacia oleracea*) y la acelga (*Beta vulgaris*); algunas, por su color, son utilizadas también como plantas de ornato (Akubugwo *et al.*, 2007; Abalone *et al.*, 2004; Arellano *et al.*, 2004; Brenner *et al.*, 2000). Recientemente se ha investigado el potencial de la harina de amaranto como antioxidante y como bebidas funcionales o energéticas, con el fin de promover la salud de los consumidores y para mejorar la resistencia física de deportistas (Almirudis-Echeverría *et al.*, 2020; Argüelles-López *et al.*, 2018; Espino-González *et al.*, 2018).

El rendimiento promedio de grano de amaranto es 1.31 t ha⁻¹ (SIAP, 2017), por lo que el cultivo de esta especie es económicamente viable (Ayala-Garay *et al.*, 2014). En San Luis Potosí, la producción de amaranto inició recientemente (González *et al.*, 2014), y por ello existe poca información

sobre su dinámica de crecimiento, la cual es importante para calendarizar labores agrícolas apropiadas para el cultivo (Sifuentes *et al.*, 2015).

El crecimiento es el incremento irreversible en el tamaño de las plantas, que está acompañado por los procesos de morfogénesis y diferenciación (Radosevich y Holt, 1984) y puede representarse mediante curvas de crecimiento (Gimplinger y Kaul, 2009). Estos procesos se pueden medir mediante la tasa absoluta de crecimiento, en función de la cantidad de materia seca acumulada y la tasa de funcionamiento de ésta (Goudriaan y Van Laar, 1994) en relación con la influencia del ambiente (Milthorpe y Moorby, 1982).

La acumulación de materia seca es el criterio más utilizado para medir el crecimiento y la magnitud del sistema de asimilación de la planta, el cual es referido frecuentemente al área foliar total (Taiz y Zeiger, 1991). Dicha acumulación varía a través del ciclo de vida del cultivo, por lo que la materia seca y área foliar son muestreadas a intervalos de días o semanas para cuantificar efectos ambientales o analizar diferencias genotípicas entre variedades de cultivos (Shibles, 1987).

Es importante señalar que los fotosintatos pueden usarse para crecimiento vegetativo, síntesis de material de almacenamiento y respiración; asimismo la proporción dirigida hacia estas tres demandas dependen de la etapa fisiológica de la planta. En plantas jóvenes, el crecimiento estructural domina, por lo que más de la mitad de los fotosintatos asimilados son usados para el crecimiento; en plantas maduras, la mayor proporción de fotosintatos son empleados en sintetizar material de almacenamiento; y durante el periodo de formación y llenado de grano o fruto aproximadamente el 80% de los fotosintatos transportados son usados como metabolitos para estos sitios de demanda (Mengel y Kirkby, 1978).

El amaranto puede desarrollarse en zonas áridas y semiáridas (Schahbazian *et al.*, 2006); sin embargo, su potencial productivo es limitado principalmente por la escasez de agua, ya sea de lluvia o de riego (Ejiejí y Adeniran, 2010), situación que puede superarse con la aplicación de tecnologías enfocadas al uso eficiente del agua, tales como el riego por goteo y la fertirrigación.

La presente investigación tuvo como objetivo estudiar la dinámica de crecimiento, acumulación y distribución de materia seca, así como la producción de forraje y grano en dos variedades de amaranto bajo condiciones de fertirrigación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en la comunidad de La Palma Pegada, municipio de Salinas, San Luis Potosí, en las coordenadas geográficas 22°43'08.0"N 101°48'19.1"W y a 2,070 msnm. El suelo utilizado se caracterizó por ser de textura franco-arenosa, pH alcalino (7.7), conductividad eléctrica baja (0.13 dS m⁻¹), presentar valores de materia orgánica (2.4%), nitrógeno (0.12%), potasio (46.8 ppm) y fósforo (98.8 ppm), que se clasifican como medio, bajo, bajo y alto, respectivamente (Moreno, 1978).

Material biológico y siembra

Se utilizó semilla de dos especies de amaranto: *A. hypochondriacus*, var. Frondosa derivada de la raza Mercado (Torres *et al.*, 2006); y *A. cruentus*, var. Dorada derivada de la raza Mexicana (Maldonado, 2014). La siembra se realizó el 21 de agosto de 2015. Ambas variedades fueron los tratamientos evaluados bajo un diseño experimental de parcelas divididas en bloques completamente al azar, con seis repeticiones. Donde la parcela grande fueron las variedades y la parcela chica las diferentes fechas de muestreo. Cada unidad experimental fue de 5.6 m² (7.0 x 0.8 m) de longitud con camas de cultivo de 40 x 30 cm (ancho x profundidad) a 80 cm de separación entre camas. Cada cama tuvo dos hileras de plantas. La distancia entre éstas fue de 20 cm y de 10 cm, respectivamente (25 plantas m⁻²).

Fertilización de fondo

Previo a la siembra, se preparó una fórmula órgano-mineral la cual consistió en 9.6 de t ha⁻¹ de estiércol de borrego (previamente cribada) y la fórmula de fertilización mineral 60-60-60 (kg ha⁻¹ de N, P₂O₅ y K₂O, respectivamente), dicha fertilización fue adicionada al suelo a una profundidad aproximada de 30 cm.

Fertirrigación

Durante el desarrollo del cultivo se suministró la fórmula de fertilización mineral 64-37-71 en un volumen de agua total de 3210 m³ ha⁻¹ distribuido en 15 fertirriegos. Esta solución nutritiva tuvo valores de conductividad eléctrica y de pH de 2.55 dS m⁻¹ y 6.1, respectivamente.

Muestras de planta

Se realizaron cinco muestreos destructivos por variedad, colectando tres plantas en cada una de las seis repeticiones, a los 33, 47, 61, 76, 96 y 103 días después de la emergencia (DDE); los primeros cuatro durante la floración y formación de grano; y el último a madurez fisiológica (cosecha).

Variables

Se evaluó: altura de planta (cm), número de hojas, área foliar (cm²), longitud de panoja (cm), diámetro de tallo (cm); peso fresco y seco de raíz, hoja, tallo, panoja y granos (g planta⁻¹), rendimiento de grano (t ha⁻¹) e índice de cosecha (IC = [Rendimiento de grano/Biomasa total]*100) (Reinaudi *et al.*, 2011), de acuerdo con la etapa fenológica.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de cada variable fueron procesados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA), prueba de Tukey 0.05 y regresión. En el ANOVA las fuentes de variación fueron variedades, muestreo e interacción variedades*muestreo. Debido a que no fue significativa esta interacción (p<0.05) y fue consistente la tendencia entre una variedad y otra a lo largo del ciclo, los promedios (por variable) de las variedades fueron comparados en cada muestreo,

mediante pruebas de Tukey 0.05 (Di Rienzo *et al.*, 2016). Las curvas de crecimiento y sus ecuaciones de regresión se obtuvieron con los programas "Microsoft Excel" (Versión 16) y Curve expert 1.4 (Hyams, 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se presentan las temperaturas promedio máximas (T_{máx}) y mínimas (T_{mín}) de los meses de agosto a diciembre en el período de 2000-2011 (12 años), así como las registradas durante el experimento (agosto a diciembre, 2015). Durante el periodo de 12 años, la T_{máx} (24.1°C) fue menor con respecto a 2015 (28.4 °C). Durante los meses de octubre, noviembre y diciembre de 2015 se registraron T_{mín} más bajas (6.5, 4.5 y 0.1°C, respectivamente), con respecto al periodo de 12 años. Sin embargo, estas temperaturas no afectaron irreversiblemente al cultivo; lo que difiere con lo señalado por Nieto (1989) y Cristaudo *et al.* (2007), quienes establecen una T_{mín} de 8 °C para que este cultivo cese su crecimiento y de 4 °C para que sufra daños fisiológicos.

Tabla 1. Temperaturas máximas y mínimas promedio de agosto a diciembre de los años 2000-2011 y del 2015 en el que se desarrolló el experimento.

Table 1. Average maximum and minimum temperatures for the August-December 2000-2011 period, and along the period of this study.

Mes	Temperatura promedio			
	Máxima		Mínima	
	2000-2011	2015	2000-2011	2015
	°C			
Agosto	26.2	28.3	12.6	10.5
Septiembre	25.1	30.4	12.0	8.2
Octubre	24.5	29.1	8.9	6.5
Noviembre	23.0	28.0	5.1	4.5
Diciembre	21.8	26.4	2.8	0.1
Promedio	24.1	28.4	8.3	6.0

Dinámica de crecimiento de las dos variedades de amaranto

La duración del ciclo de desarrollo fue de 103 días para *A. cruentus* y de 96 días para *A. hypochondriacus* (Tabla 2), lo cual se puede asociar con las condiciones climáticas bajo las cuales se desarrolló el presente estudio, aunque Rivelli *et al.* (2008) establecen un ciclo de cultivo más largo para *A. cruentus* (115 días) y para *A. hypochondriacus* (150 días) en el periodo junio a septiembre, en el que regularmente se registran temperaturas mínimas menos frías.

En altura final (96 DDE), Dorada (173.8 cm) no se diferenció de Frondosa (162.2 cm), en contraste con lo registrado a los 75 DDE, cuando la primera variedad superó en tamaño a la segunda (Tabla 2). Torres *et al.* (2006) reportan que Frondosa presenta porte intermedio (170.0 cm). Sin embargo, Mapes *et al.* (1995) encontraron una menor altura para esta variedad (144.1 cm); estos mismos autores encontraron una altura similar (172.6 cm) a la de este estudio para la variedad Dorada.

La mayor tasa de crecimiento (altura/DDE) se obtuvo a los 33 y 47 DDE con la variedad Frondosa (3.17 cm día⁻¹) y Dorada (3.77 cm día⁻¹), respectivamente (Figura 1); periodo durante el cual la temperatura máxima (30.4 °C) y mínima (8.9 °C) se mantuvieron dentro del rango de crecimiento óptimo propuesto por Cristaudo *et al.* (2007).

El número total de hojas (Tabla 2) se alcanzó a los 76 DDE y fue diferente entre variedades: 46 y 37 para Frondosa y Dorada, respectivamente. A los 47 DDE se observaron las mayores tasas de crecimiento en altura y en número de hojas en ambas variedades, que a dicha etapa de desarrollo habían acumulado el 48.9 y 46.04% de su requerimiento térmico total, expresado en unidades calor °C (UC), el cual fue de 910.7 y 968.6 para Frondosa y Dorada, respectivamente (Tabla 2). Estos valores son similares a los reportados por García-Pereyra *et al.* (2007) para *A. hypochondriacus* (959.0 – 977.3 UC) y *A. cruentus* (959.5 UC) durante el mismo periodo en que se desarrolló el presente estudio, e inferiores a lo encontrado (1629 UC) en los Valles Altos (Díaz-Ortega *et al.*, 2004). El presente resultado constituye la primera referencia de UC para el cultivo de amaranto en el Altiplano Potosino en el ciclo otoño-invierno bajo condiciones de fertilización.

Los valores más altos de biomasa fresca (forraje fresco) se obtuvieron a los 76 DDE, siendo superior (P<0.05) Dorada (278.4 g planta⁻¹ o 62.6 t ha⁻¹), respecto a Frondosa (201.2 g planta⁻¹ o 45.2 t ha⁻¹) (Tabla 2). Los resultados obtenidos se encuentran dentro del rango reportado para forraje fresco de *Amaranthus* spp, que va de 10 a 70 t ha⁻¹ en función de la variedad, condiciones ambientales y manejo agronómico (Stordahl *et al.*, 1999; Svirskis, 2003). Con *A. hypochondriacus*, bajo condiciones de riego para el ciclo primavera-verano, el rendimiento de forraje fresco es de 53 t ha⁻¹ (Chávez-Servín *et al.*, 2017), aunque puede variar entre 22.7 a 72.5 t ha⁻¹ (Pereyra *et al.*, 2004).

El área foliar de *A. hypochondriacus* variedad Frondosa se incrementó de los 33 a 63 DDE (de 1002 a 1827 cm² planta⁻¹); posterior a este periodo, disminuyó gradualmente debido a la disminución de hojas ocurrida a la madurez fisiológica, llegando a 325.9 cm² planta⁻¹ al final del ciclo; *A. cruentus* variedad Dorada tuvo la misma tendencia, pero con el valor máximo a los 76 DDE (Figura 2). Los valores obtenidos en *A. cruentus* (1521 cm² planta⁻¹) durante la etapa de floración coinciden con los encontrados por De la Cruz-Guzmán *et al.* (2010). Con base en la presente investigación se infiere que *A. hypochondriacus* tuvo mayor capacidad de producir fotoasimilados, y por lo tanto generó mayor rendimiento de grano.

Dinámica de crecimiento y acumulación de materia seca

La materia seca acumulada al final del ciclo de cultivo no fue diferente (P<0.05) entre Frondosa (46.93 g planta⁻¹) y Dorada (42.53 g planta⁻¹); sin embargo, su dinámica durante dicho ciclo fue desigual. La mayor tasa de acumulación de materia seca ocurrió durante el periodo de 47 a 61 DDE para Frondosa (1.18 g planta día⁻¹) y de 61 a 76 DDE para Dorada (1.09 g planta día⁻¹).

Tabla 2. Evaluación de variables por planta y unidades calor durante el ciclo de cultivo de las variedades de amaranto Frondosa y Dorada.
Table 2. Plant variables and heat units measured during the growth cycle of Frondosa and Dorada amaranth varieties.

Variedad	Variable	Unidades	Días después de la emergencia (DD)					
			33	47	61	76	96	103
Fronrosa	Altura	cm	58.5 a	103.0a	136.5 a	144.4 b	162.17 a	----
Dorada			62.1 a	115.0a	152.1 a	172.2a	173.4a	173.8
Fronrosa	Hojas	No.	15 a	30 a	40 a	46 a	12 b	
Dorada			14 a	21 b	24b	37b	20 a	10
Unidades calor (UC)		°C	292.5	153.5	141	140	183.7	57.9
UC acumuladas			292.5	446	587	727	910.7	968.6
Fronrosa	Biomasa	g	50.2 a	141.2a	191.6 a	201.2 b	160.8 a	---
Dorada			86.8 a	185.1 a	258.2 a	278.4a	195.8 a	141.2

Medias con la misma letra en cada columna y variable no son estadísticamente diferentes (Tukey P<0.05). Means with the same letter are not statistically different (Tukey P<0.05).

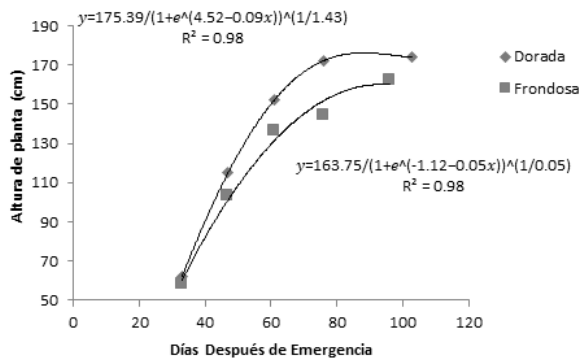


Figura 1. Altura de planta durante el ciclo de cultivo de dos variedades de Amaranto.
Figure 1. Plant height during the growth cycle of two varieties of amaranth.

En general, se espera que la materia seca se acumule en mayor proporción en las estructuras reproductivas (grano, frutos) y en menor cantidad en las estructuras vegetativas; sin embargo, el desarrollo de un cultivo depende de la especie, época del año y condiciones ambientales (Andriolo y Falcão, 2000).

En el presente estudio, la panoja incrementó su longitud linealmente en ambas variedades, pero apareció en menor tiempo (47 DDE) y presentó mayor tasa de elongación (0.38 cm día⁻¹) en Frondosa respecto a Dorada (0.19 cm día⁻¹) (Figura 3 a). Frondosa también tuvo la panoja más larga, con más peso y mayor producción de grano como se presentará adelante (Tabla 3).

La acumulación de materia seca en hoja y tallo (Figura 3 b y c) tuvo incrementos decrecientes, que se ajustaron a una ecuación cuadrática, cuyo máximo valor coincidió con la etapa de formación de grano (76 DDE), ya que éste desde su aparición demanda productos para su desarrollo (Vaieretti *et al.*, 2007). En la Figura 3 (b y c) se observa que los valores máximos de acumulación en estas dos variables corresponden a Frondosa, coincidente con mayor rendimiento de biomasa fresca (Tabla 1). Adelante, en acumulación relativa

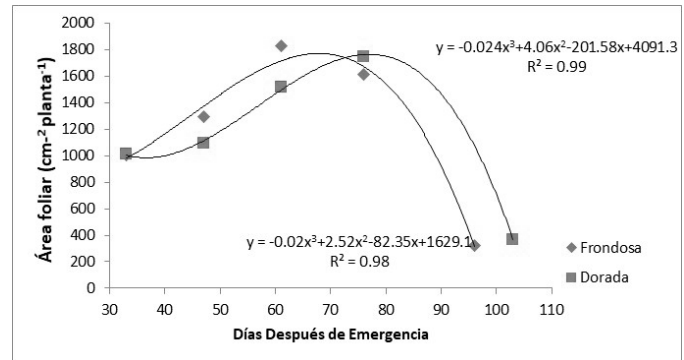


Figura 2. Modelos matemáticos para el área foliar durante el ciclo de cultivo de dos variedades de amaranto.
Figure 2. Mathematical models for leaf area during the growth cycle of two amaranth varieties

de biomasa seca se presentará que la suma de hoja+tallo es mayor (P<0.05) en Dorada, en tanto que el peso seco de la panoja es mayor en Frondosa.

La acumulación de materia seca en la raíz es de tipo sigmoideal y polinómica (cúbica) en Dorada y Frondosa, respectivamente, con incrementos más pequeños en ambos modelos a partir de la floración (Figura 3d), lo cual puede asociarse a la demanda de fotosintatos de la panoja para la formación de grano (Nielsen y Veierskov, 1998). Los modelos mostraron que la raíz tiene un desarrollo en peso similar en ambas variedades desde la emergencia hasta la aparición de la panoja y posteriormente Dorada tuvo una mayor acumulación de biomasa seca.

Partición de biomasa total

La partición relativa de la biomasa seca, la suma de raíz, tallo, hoja y panoja, se presentan en la Figura 4. En el análisis de los resultados, la mayor asignación de biomasa en la panoja inició desde los 47 DDE en la variedad Frondosa, con un 4.09% y llegando hasta un 47.13% a los 96 DDE. Estos valores fueron superiores (P<0.05) a los cuantificados en la variedad Dorada, en la que la asignación de materia sinteti-

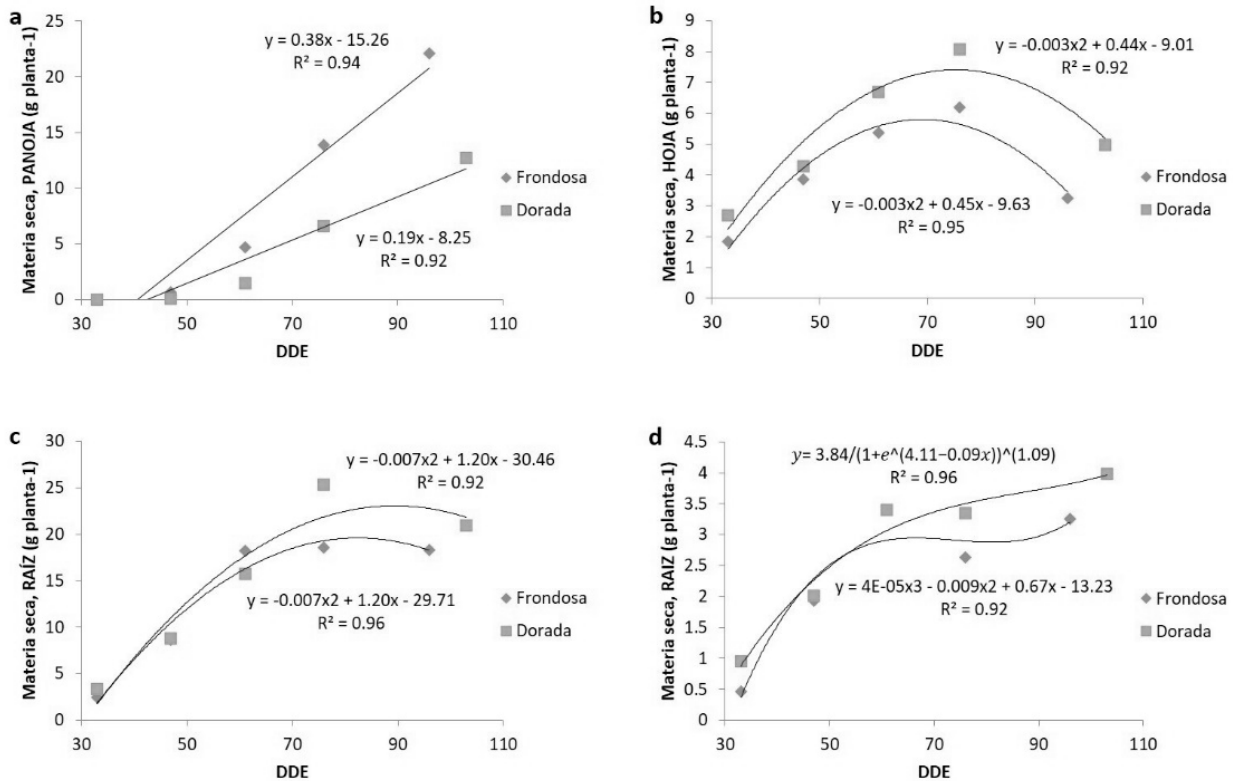


Figura 3. Acumulación de materia seca en función de los días después de la emergencia (DDE): (a) panoja, (b) hoja, (c) tallo y (d) raíz de dos variedades de amaranto.

Figure 3. Dry mass accumulation in panicle (a), leaves (b), stem (c), and root (d) of two amaranth varieties vs days after emergence.

Tabla 3. Longitud y peso final de la panoja, número de granos g⁻¹, rendimiento de grano e índice de cosecha de dos variedades de amaranto.

Table 3. Final length and weight of panicle, number of grains g⁻¹, grain yield, and harvest index of two amaranth varieties.

Variedad	Panoja		Granos por g	Grano	Índice de cosecha
	cm	g	No.	t ha ⁻¹	%
Frondosa	39.0 a	22.1 a	1131 b	2.30 a	18.0 a
Dorada	33.3 a	12.7 b	1206 a	1.40 b	12.0 b

Medias con la misma letra en cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey P<0.05).
Means with the same letter are not statistically different (Tukey P<0.05).

zada en la misma etapa (47 DDE) sólo presentó un 0.58% y al final del ciclo (103 DDE) alcanzó un coeficiente de partición de materia seca en panoja de sólo 29.79%.

Asimismo, en ambas variedades se observó que el porcentaje de partición de materia seca de las hojas fue más alto a los 33 DDE (alrededor del 38%), disminuyendo a medida que se desarrolló el cultivo. Los valores más bajos se tuvieron al final del ciclo de crecimiento (6.93 y 11.70%, 96 y 103 DDE, Frondosa y Dorada, respectivamente). Lo anterior ocurre debido a que los fotoasimilados están involucrados en la producción foliar y viceversa; conforme transcurre el ciclo de vida de la planta disminuye progresivamente la cantidad de fotoasimilados involucrados en la producción foliar (Vaieretti *et al.*, 2007) y consecuentemente la cantidad de fijación de carbono y la acumulación de materia seca.

En cuanto a tallo, con excepción del porcentaje de partición, a los 96 DDE, de la variedad Frondosa (39.1%), la

partición de biomasa seca durante todo el ciclo fue mayor hacia esta estructura, alcanzando valores de hasta 57.63% y 58.58% a los 61 DDE en las variedades Frondosa y Dorada; respectivamente. Esto coincide con lo reportado por Rivelli *et al.* (2008) en especies de amaranto cultivadas en el Mediterráneo en los meses de junio a septiembre.

En ambas variedades se observó que la panoja para su desarrollo demanda fotoasimilados, causando reducción relativa en las demandas de las otras partes de la planta, siendo más significativa en la raíz, que de acuerdo con Nielsen y Veierskov (1998) puede deberse principalmente a la distancia entre el sistema radical y el aparato fotosintético, dando como resultado una baja prioridad en la partición de demanda de fotosintatos; resultado que sugiere que el efecto primario de un incremento en la demanda por causa de la panoja ocasiona una disminución del crecimiento relativo de la raíz; lo cual puede tener relación incluso con una

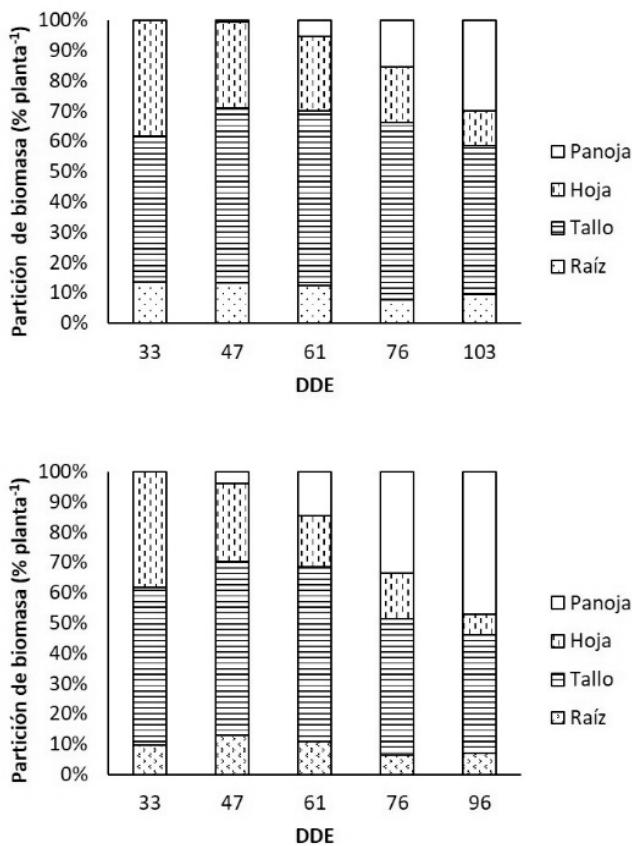


Figura 4. Partición relativa de biomasa en las variedades de amaranth Frondosa (a) y Dorada (b) en función de los días después de la siembra (DDE).

Figure 4. Relative partition of biomass in two amaranth varieties Frondosa (a) Dorada (b) vs days after emergence (DDE).

mayor eficiencia energética ejercida por la planta, dirigida a la mayor producción de frutos y semillas para asegurar la reproducción.

Al considerar sólo las partes reproductivas (panoja) y vegetativa (hoja y tallo) de la planta, se observó que a lo largo del ciclo Frondosa aporta mayor acumulación de biomasa a su estructura reproductiva, logrando a los 96 DDE una acumulación relativa de 47.13%, respecto a los 45.94% que acumula en la parte vegetativa en el mismo momento. En tanto, Dorada muestra un comportamiento diferente, presentando una acumulación de 60.85% en la parte vegetativa a los 103 DDE, comparado con 29.79% en panoja. Este comportamiento coincide por lo reportado en otros trabajos (Becerra, 2000; Morales *et al.*, 2014), donde se menciona que *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* son especies productoras de grano, siendo que las variedades derivadas de la primera generalmente presentan tendencia a generar follaje, en tanto que las variedades derivadas de la segunda concentran su producción en grano.

Componentes del rendimiento del grano

En la Tabla 3 se presentan los componentes del rendimiento de las variedades estudiadas. A la cosecha, en longitud de panoja no existió diferencia ($P < 0.05$) entre am-

bas variedades, con valores de 39 y 33 cm para Frondosa y Dorada, respectivamente, que son inferiores a los reportados por Díaz-Ortega *et al.* (2004) (61 cm). El peso de la panoja de Frondosa fue significativamente superior al de Dorada (23.8 vs 14.0 g planta⁻¹) y con menor número de granos g⁻¹ (1131 vs 1206 g por planta⁻¹). El rendimiento de grano fue más alto en Frondosa (2.3 t ha⁻¹) que en Dorada (1.4 t ha⁻¹) lo cual está relacionado con el peso promedio de granos. SIAP (2016) reporta para *Amaranthus* spp bajo riego rendimientos de grano de 2.13 y 0.9 t ha⁻¹, para los ciclos Primavera-Verano y Otoño-Invierno, respectivamente. En la presente investigación se obtuvieron valores superiores en 155% y 55% para Frondosa y Dorada, respectivamente, lo cual se atribuye al uso de Fertirriego. Díaz-Ortega *et al.* (2004) reportan un menor rendimiento para la variedad Frondosa (1.8 t ha⁻¹) en el ciclo primavera-verano, utilizando mayor volumen de agua y fertilización, con la misma densidad de población que la utilizada en el presente estudio. Chávez-Servín *et al.* (2017) obtuvieron un rendimiento de 1.4 t ha⁻¹ con 150000 plantas ha⁻¹ en el ciclo primavera-verano bajo condiciones de riego.

El índice de cosecha (IC) fue superior ($P < 0.05$) en la variedad Frondosa (18.0%) con respecto a la variedad Dorada (12.0%). Estos valores se encuentran en el rango encontrado en la literatura de amaranto: 11.4% para raza azteca (Díaz-Ortega *et al.*, 2004) y 10.5-22.5% en especies domésticas (Reinaudi *et al.*, 2011).

Uso eficiente del agua

En referencia a la eficiencia en el uso del agua (EUA), considerando una lámina de 321.4 mm en el ciclo, ésta fue mayor ($P < 0.05$) en la producción de biomasa fresca en la variedad Dorada 216.6 kg mm⁻¹ con respecto a Frondosa (156.5 kg mm⁻¹); para la producción de grano, la EUA fue mayor ($P < 0.05$) en la variedad Frondosa (7.15 kg mm⁻¹) que en Dorada (4.35 kg mm⁻¹). En grano, la EUA de ambas variedades fue mayor al reportado por Díaz-Ortega *et al.* (2004).

La EUA de la variedad para forraje y grano, respectivamente, confirma el uso primordial que puede darse a cada una de las variedades, producción de grano o forraje, bajo las condiciones en que se desarrollaron.

CONCLUSIONES

Durante la etapa vegetativa, a los 47 DDE, la acumulación de UC del amaranto fue: 49% de 910.7 °C (Frondosa) y 46% de 978.6 °C (Dorada). Estos resultados son la primera referencia para dicha planta en el Altiplano Potosino. La variedad Dorada, comparada con la Frondosa, presentó: crecimiento más rápido; mayor altura (173.8 vs 162.2 cm); mayor biomasa fresca total (278.4 vs 201.2 g planta⁻¹) y seca de raíz. Frondosa alcanzó la máxima área foliar en menor tiempo. La variedad Frondosa, respecto a la Dorada, mostró: mayor número de hojas (46 vs 37) y longitud de panoja (29 vs 33.3 cm); mayor biomasa seca en panoja (22.1 vs 12.7 g), tallo y hojas; formación de panoja en menor tiempo; mayores Índice de cosecha (18 vs 12%) y rendimiento (2.3 vs 1.4 t ha⁻¹).

En rendimiento de grano, la EUA fue mayor en Frondosa, respecto a Dorada (7.15 vs 4.35 kg mm⁻¹). En producción de forraje, la EUA fue mayor en Dorada, respecto a Frondosa (216.6 vs 156.5 kg mm⁻¹). Las condiciones ambientales del Altiplano Potosino son favorables para producir amaranto para grano (Frondosa) y forraje (Dorada) con fertigación.

REFERENCIAS

- Abalone, R., Cassinera, A., Gastón, A. y Lara, M.A. 2004. Some Physical Properties of Amaranth Seeds. *Biosystems Engineering*. 89: 109-117.
- Akubugwo, I. E., Obasi, N. A., Chinyere, G. C. y Ugbo, A. E. 2007. Nutritional and chemical value of *Amaranthus hybridus* L. leaves from Afikpo, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. 6: 2833-2839.
- Almirudis-Echeverría, S. J., Ramírez, W. B., Medina, R. C. L. Magaña, B. E., Torres, Ch. P. I., y Ledesma, O. A.I. 2018. Actividad antioxidante de harinas de amaranto obtenidas por extrusión y análisis parcial de su calidad proteica in vivo. *Biotecnia*. 22 (1): 24-31.
- Andriolo, J.L. y Falcão, L.L. 2000. Efeito da poda de folhas sobre a acumulação de matéria seca e sua repartição para frutos do tomatero cultivado em ambiente protegido. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*. 8:75-83.
- Arellano, M.A., Albarracín, G., Arce, S. y Mucciarelli, S. 2004. Estudio comparativo de hojas de *Beta vulgaris* con *Amaranthus dubuis* Mart ex Thell. *Phyton*. 53: 193-197.
- Argüelles-López, O.D., Reyes-Moreno, C., Gutiérrez-Dorado, R., Sánchez-Osuna, M. F., López-Cervantes, J., Cuevas-Rodríguez, E. O., Milán-Carrillo, J., Perales-Sánchez, J. X. K. 2018. Functional beverages elaborated from amaranth and chia flours processed by germination and extrusión. *Biotecnia* 20 (3):135-45.
- Ayala-Garay, A.V., Rivas Valencia, P., Cortes Espinoza, L., de la O Olán, M., Escobedo López, D. y Espitia Rangel, E. 2014. La rentabilidad del cultivo de amaranto (*Amaranthus* spp.) en la región centro de México. *Ciencia Ergo Sum*. 21: 47-54.
- Becerra, R. 2000. El amaranto: nuevas tecnologías para un antiguo cultivo. *CONABIO. Biodiversitas*. 30: 1-6.
- Brenner, D.M., Baltensperger, D.D., Kulakow, P.A., Lehmann, J.W., Myers, R.L., Slabbert, M.M. y Sleugh, B.B. 2000. Genetic resources and breeding of *Amaranthus*. *Plant Breeding Reviews*. 19: 227-285.
- Chávez-Servín, J.L., Cabrera Baeza, H.F., Jiménez Ugalde, E.A., Mercado Luna, A., de la Torre-Carbot, K., Escobar García, K., Barreyro, A., Serrano Arellano, J. y García-Gasca, T. 2017. Comparison of Chemical Composition and Growth of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) between Greenhouse and Open Field Systems. *International Journal of Agriculture and Biology*. 19: 577-583.
- Costea, M., Sanders, A. y Waines, G. 2001. Preliminary results towards a revision of the *Amaranthus hybridus* complex (Amaranthaceae). *Sida, Contributions to Botany*. 19: 931-974.
- Cristaudo, A., Gresta, F., Luciani, F. y Restuccia, A. 2007. Effects of after-harvest period and environmental factors on seed dormancy of *Amaranthus* species. *Weed Research*. 47: 327-334.
- De la Cruz-Guzmán, G.H., Arriaga Frías A., Mandujano Piña M. y González Moreno S. 2010. Efecto de la sequía sobre algunas variables hídricas y morfométricas en cinco genotipos de *Amaranthus*. *Idesia (Arica)*. 28: 87-95.
- Díaz-Ortega, A.C., Escalante Estrada, J.A., Trinidad Santos, A., Sánchez García, P., Mapes Sánchez, C. y Martínez Moreno, D. 2004. Rendimiento, eficiencia agronómica del nitrógeno y eficiencia en el uso del agua en amaranto en función del manejo del cultivo. *Terra Latinoamericana*. 22: 109-116.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C.W. 2016. InfoStat. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Ejjeji, C.J. y Adeniran, K.A. 2010. Effects of water and fertilizer stress on the yield, fresh and dry matter production of grain amaranth (*Amaranthus cruentus* L.). *Australian Journal of Agricultural Engineering*. 1:18-24.
- Espino-González, E., Muñoz-Daw, M.J., Rivera-Sosa, J. M., De la Torre-Díaz, M. L., Cano-Olivas, G. E., De Lara-Gallegos, J. C., y Enríquez-Leal, M. C. 2018. The influence of an amaranth-based beverage on cycling performance: a pilot study. *Biotecnia*. 20 (2): 31-36.
- García-Pereyra, J., Aviña Martínez, G.N., Rubio Graciano, R.B., Medina Medrano, R., Alvarado Gómez, O. y Alejandro Iturbide, G. 2007. Requerimiento de unidades calor en el cultivo del amaranto. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*. 5: 1411-1421.
- Gimplinger, D., & Kaul, H. 2009. Calibration and validation of the crop growth model LINTUL for grain amaranth (*Amaranthus* sp.). *Journal of applied botany and food quality*. 82: 183-192.
- González, A.F.R., Vera, G.A. y Lerma, A.D.L. 2014. Estrategia de comercialización competitiva del amaranto en San Luis Potosí. *PERSPECTIVAS. Revista de Análisis de Economía, Comercio y Negocios Internacionales*. 10: 71-93.
- Goudriaan, J.Y. y Van Laar, H.H. 1994. Modelling potential growth processes. Textbook with exercises. Kluwer Academic Publishers. Springer. Heidelberg Germany.
- Hyams, D. 2010. Curve Expert software. Disponible en: https://docs.curveexpert.net/curveexpert/basicv1/_static/CurveExpertBasic.pdf.
- Maldonado, E. 2014. Análisis proteínico del grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* y *A. cruentus*) y obtención del mapa proteómico de *Amaranthus cruentus*. Tesis Doctorado, IPICYT.
- Mapes, C., Díaz, A., Collazo, M. y Bye Robert. 1995. Desarrollo de cinco razas de amaranto (*Amaranthus* spp.) en Chalco, Estado de México. *Anales Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica*. 66: 149-169.
- Mengel, K. y Kirkby, E.A. 1978. Principles of plant nutrition. International Potash Institute. Worblaufen-Bern, Switzerland.
- Milthorpe, F.L. y Moorby, J. 1982. An Introduction to Crop Physiology. Cambridge University Press. UK.
- Morales, J., Vázquez, N. y Bressani, R. 2014. El amaranto Características y aporte nutricional. 2a ed. Trillas. México.
- Maurya, N.K. & Arya, D.P. 2018. Amaranthus grain nutritional benefits: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 7(2):2258-2262.
- Nielsen, T.H. y Veierskov B, 1998. Distribution of dry matter in sweet pepper plants (*Capsicum annuum* L.) during the juvenile and generative growth phases. *Scientia Horticulturae*. 35:179-187.
- Nieto, C. 1989. El cultivo de amaranto (*Amaranthus* spp): Una alternativa agronómica para Ecuador. INIAP 52-28. Estación Experimental Santa Catalina. Quito.

- Paredes-López, O., Guevara- Lara, F. y Bello-Pérez, A. 2006. Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas. 1a ed. Ed. Fondo de Cultura Económica. México.
- Pereyra, G.J., Valdés, L.C.G.S., Olivares, S.E., Alvarado, G.O., Medrano, R.H. y Alejandre, I. G. 2004. Evaluación de variedades de amaranto para adaptabilidad productiva en el noreste de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 27: 53-56.
- Radosevich, S.R. y Holt, J.1984. Weed ecology, implications for vegetation management. Jhon Willey and Sons. New York.
- Reinaudi, N.B., Repollo, R., Janovská, D., Délamo Frier, J. y Martín de Troiani, R. 2011. Evaluación de genotipos de amaranto (*Amaranthus* spp.) para la adaptabilidad productiva en el área de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de la Pampa, Argentina. *Revista Científica UDO Agrícola*. 11: 50-57.
- Rivelli, A.R., Gherbin, P., De Maria, S. y Pizza, S. 2008. Field evaluation of *Amaranthus* species for seed and biomass yields in Southern Italy. *Italian Journal of Agronomy*. 3: 225-9.
- Schahbazian, N., Kamkar, B., Iran-Nejad H. 2006. Evaluation of Amaranth Production Possibility in arid and semi arid Regions of Iran. *Asian J. of Plant Scie*. 5: 580-585.
- SIAP. 2017. Atlas agroalimentario. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Disponible en: <http://online.pubhtml5.com/clsi/ibhs/#p=4>.
- SIAP. 2016. Acciones y Programas – Producción Agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>.
- Sibbles, R. 1987. *Crop physiology*. Iowa State University. Iowa, IA, U.S.A. 214 pp.
- Sifuentes, E., Ruelas, J.R., Cervantes, J., Castorena, I., Mondaca, C.A. y López, B.E. 2015. Fenología y tiempo en el manejo del riego y fertilización del cultivo de papa. *Biotecnia*. 17: 42-48.
- Stordahl, J.L., Sheaffer C.C. y Di Costanzo A. 1999. Variety and maturity affect amaranth forage yield and quality. *Journal of Production Agriculture*. 12:249-253.
- Svirskis, A. 2003. Investigation of amaranth cultivation and utilization in Lithuania. *Agronomy Research*. 1: 253-264.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 1991. *Plant physiology: Mineral nutrition*. The Benjamin Cummings Publishing Co., Inc. Redwood City.
- Torres, S.G., Trinidad, S.A., Reyna, T.T., Castillo, J.H., Escalante, E.A. y León, G.F. 2006. Respuesta de variedades de amaranto a densidades de población. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 29: 307-312.
- Vaieretti, M.V., Diaz, S., Ville, E. y Garnier, E. 2007. Two measurement methods of leaf dry matter content produce similar results in a broad range of species. *Annals of Botany*. 99: 955-958.

Evaluación del desarrollo y la estabilidad de una nanoemulsión de vainilla (*Vanilla planifolia*) a partir de un extracto no alcohólico

Evaluation of the development and stability of a vanilla (*Vanilla planifolia*) emulsion from a non-alcoholic extract

Liliana G. Mendoza Sánchez, Melissa Rodríguez España, Javier Martínez Rodríguez, Hugo S. García Galindo*, Javier De la Cruz Medina, Cynthia Cano Sarmiento y José A. Monroy Rivera†

UNIDA, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Veracruz, M.A. de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar, Veracruz, Ver. 91897

RESUMEN

La vainilla (*Vanilla planifolia*) es considerada como el saborizante de mayor importancia en el mundo. Sin embargo, su aplicación en alimentos está limitada, ya que se comercializa principalmente como extractos etanólicos, debido a su naturaleza lipofílica. El objetivo de este trabajo fue elaborar nanoemulsiones de vainilla libre de alcohol, a partir de un extracto natural mediante homogenización por altas presiones, como estrategia para mejorar su solubilidad y estabilidad. El efecto de la presión y el número de ciclos se evaluaron mediante un diseño factorial de 2^{3*3} . Las emulsiones óptimas se almacenaron a 15, 25 y 35 °C durante 42 días. A las emulsiones obtenidas se les evaluó tamaño de partícula e índice de estabilidad (TSI). La formulación óptima para generar una emulsión estable sin azúcar requirió 5 ciclos a una presión de 40 MPa, mientras que para la emulsión con azúcar fueron necesarios 9 ciclos a una presión de 20 MPa, con un contenido de 17 % de glicerol. La emulsión se mantuvo estable a 15 y 25 °C durante 42 días. Los hallazgos de este estudio conducirán a la posibilidad de que esta formulación se utilice como uno de los métodos para mejorar su solubilidad y estabilidad.

Palabras clave: *Vanilla planifolia*, emulsión, alta presión, estabilidad.

ABSTRACT

Vanilla (*Vanilla planifolia*) is considered the most important flavoring in the world. However, its application in foods is limited, since it is mainly commercialized as ethanolic extracts, due to its lipophilic naturalization. The objective of this work was to elaborate alcohol-free vanilla nanoemulsions, from a natural extract by means of high pressure homogenization, as a strategy to improve its solubility and stability. The effects of pressure and number of cycles were evaluated by means of a 2^{3*3} factorial design. The optimal emulsions were stored at 15, 25 and 35 °C for 42 days. The obtained emulsions were evaluated for particle size and stability index (TSI). The optimum formulation to prepare a stable emulsion without sugar required 5 cycles at a pressure of 40 MPa, while for the emulsion with sugar, 9 cycles were necessary at a pressure of 20 MPa; with a content of 17 % glycerol. The emulsion remained stable at 15 and 25 °C for

42 days. The findings of this study will lead to the possibility for the use of this formulation as a method to improve its solubility and stability.

Keywords: *Vanilla planifolia*, emulsion, high pressure, stability.

INTRODUCCIÓN

La vainilla es considerada como uno de los saborizantes más populares del mundo; es obtenida principalmente de *Vanilla planifolia*, una especie de orquídea trepadora tropical. México es el centro de origen y su domesticación, pero actualmente se cultiva en muchos países (Gonzalez-Arno *et al.*, 2009). La vainillina natural se extrae de las vainas de vainilla mediante un proceso de extracción de alcohol etílico adecuado. La FDA definió un extracto de vainilla como una solución que contiene no menos de 35 % de alcohol etílico extraído de 13.35 oz de vainas de vainilla y que contiene más de 25 % de humedad en un galón de producto terminado, y sin adición de vainillina sintética (Waliszewski *et al.*, 2007).

El sabor y aroma característico del extracto de vainilla es desarrollado en las vainas debidamente curadas, y es el resultado de una serie de transformaciones bioquímicas, donde se han identificado más de 200 componentes, siendo el ácido *p*-hidroxibenzoico, el *p*-hidroxibenzaldehído y el ácido vainillico los principales compuestos que le otorgan el sabor y el aroma característico a vainilla (Sostaric *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 2007; Khoyratty *et al.*, 2018).

Se usa regularmente en la industria artesanal, tabaco, cosméticos, farmacéutica, de alimentos y bebidas (Sinha *et al.*, 2007). Sin embargo, debido a su naturaleza moderadamente lipofílica, generalmente es utilizada como extracto etanólico, lo que limita su uso dentro de la industria alimentaria. El uso de emulsiones, es una estrategia tecnológica que permite mejorar la solubilidad en agua y reducir la degradación o disminución de aroma, sabor y propiedades fisicoquímicas, nutricionales y funcionales durante el procesamiento y almacenamiento, proporcionando durabilidad y protección frente a factores externos como calor, luz y humedad (Jafari *et al.*, 2017).

Las emulsiones de acuerdo con su tamaño de partícula y propiedades se pueden clasificar en macroemulsiones de diámetros de gota mayores a 1 µm, microemulsiones de

diámetros de gota en el rango entre 10 y 50 nm, y nanoemulsiones con un tamaño de gota típicamente entre 20 nm y 500 nm (Yalçınöz y Erçelebi, 2018).

La formulación de nanoemulsiones consiste en mezclar al menos tres componentes, siendo fase oleosa y acuosa más un estabilizador. En general, las nanoemulsiones se pueden preparar utilizando métodos de alta o baja energía (Anton *et al.*, 2008). Los métodos de baja energía se basan en la formación espontánea de diminutas gotas de aceite dentro de sistemas mixtos de aceite, agua y emulsionantes cuando se alteran la solución o las condiciones ambientales, como la composición o la temperatura (Qian y McClements, 2011). Mientras que, los métodos de alta energía, consisten en aplicar altas fuerzas disruptivas con dispositivos mecánicos, como homogeneizadores de alta presión o sonificadores, capaces de provocar la rotura de las gotas de aceite y dispersarlas en la fase acuosa (Tadros *et al.*, 2004).

La estabilidad de las nanoemulsiones se puede mejorar incorporando estabilizadores como tensoactivos de moléculas pequeñas (Tweens o Spans), polisacáridos (goma arábica o almidón modificado), fosfolípidos (lecitina de soya, huevo o lácteos) y proteínas anfífilas (caseinatos o aislados de proteína de suero); también se pueden utilizar modificadores de textura, empleando sustancias que aumentan la viscosidad como proteínas (aislados de proteína de suero, gelatina o aislados de proteína de soya), polisacáridos (carragenanos, xantana, pectina, alginato), polioles (sorbitol o glicerol) y azúcares (jarabe de maíz con alto contenido de fructosa o sacarosa) (Salem y Ezzat, 2009).

No obstante, el diseño exitoso y su estabilidad, dependen de una serie de factores, como la selección adecuada de los componentes de la misma y el método de procesamiento. (Kralova y Sjöblom, 2009). Por lo que el objetivo de este estudio fue optimizar la formulación y el proceso de emulsificación de vainilla generadas por altas presiones a partir de un extracto no alcohólico, y estudiar su estabilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los compuestos químicos y solventes utilizados fueron grado analítico o HPLC: ácido acético glacial (Baker), Metanol (Burdick y Jackson®), Agua (Burdick y Jackson®), Etanol (Merck) y Glicerol (Golden Bell). Los estándares de

vainillina, ácido vainílico, *p*-hidroxibenzaldehído y ácido *p*-hidroxibenzoico, fueron obtenidos de Sigma (Sigma Chemicals, St. Louis, MO). Los emulsificantes empleados fueron lecitina de Soya (Pronot ultra), Tween 20 (Sigma) y Goma Guar (Sinergum).

Diseño experimental

El estudio se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa, se evaluó el efecto de la formulación (Tabla 1), y procesamiento sobre la estabilidad de las emulsiones durante 7 días. En la segunda etapa, las emulsiones óptimas fueron almacenadas a temperaturas controladas, 15, 25 y 35 °C, durante 42 días, para estudiar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la emulsión.

Para desarrollar una formulación óptima de emulsiones de vainilla preparadas por altas presiones, se realizó un diseño de experimentos 2³*3, por lo que en la primera etapa se evaluó el concentrado de vainilla con y sin azúcar (dos variables), presión, número de ciclos y concentración de glicerol (3 niveles) * 3 temperaturas de almacenamiento. En la Tabla 2, se muestra el tratamiento que recibió cada una de las 24 emulsiones, evaluando la concentración de glicerol, presión y el número de ciclos en las emulsiones con y sin azúcar.

Concentrado de vainilla

Para eliminar el etanol presente en el extracto de vainilla, se realizó un proceso de evaporación a un lote de 60 L de extracto alcohólico de vainilla con un equipo rotavapor (BÜCHI R-210, Büchi Corp., New Castle, DE), ejerciendo una evaporación al vacío en un rango de 7 a 2.5 kPa y temperatura constante de 25 °C, procesando 1 L/h de extracto de vainilla con alcohol.

Análisis cromatográfico

Se efectuó la cuantificación de los componentes químicos presentes en el extracto alcohólico de vainilla por HPLC, de acuerdo con lo descrito en el Método Oficial de la AOAC 990.25 (AOAC, 1996), con algunas modificaciones. Las separaciones de cromatografías de HPLC se realizaron en un equipo Waters (Milford, MA) a un flujo de 1 mL/min, usando una bomba binaria Waters 1525, detección a 254 nm con un detector UV-visible Waters 2487. Se inyectaron 10 µL de muestra mediante un auto-muestreador Waters 717 plus. La

Tabla 1. Formulación de las emulsiones de vainilla con y sin azúcar.

Table 1. Formulation of vanilla emulsions with and without sugar.

Formulación	Composición (%)						
	Concentrado de Vainilla	Lecitina	Tween 20	Goma guar	Glicerol	Azúcar	Agua
A	33.5	0.5	1.0	0.25	3.5	5	56.25
B	33.5	0.5	1.0	0.25	3.5	-	61.25
C	33.5	0.5	1.0	0.25	7	5	52.75
D	33.5	0.5	1.0	0.25	7	-	57.75
E	33.5	0.5	1.0	0.25	10	5	49.75
F	33.5	0.5	1.0	0.25	10	-	54.75

Tabla 2. Diseño experimental para la preparación de emulsiones a partir de concentrado de vainilla con y sin azúcar.

Table 2. Experimental design for the preparation of emulsions from vanilla concentrate with and without sugar.

Emulsión	Formulación	Presión	Ciclos	Glicerol
		(MPa)		(%)
1	A	20	5	3.5
2	C	40	5	7
3	E	20	5	10
4	A	40	5	3.5
5	C	20	5	7
6	E	40	5	10
7	A	20	9	3.5
8	C	20	9	7
9	E	20	9	10
10	A	40	9	3.5
11	C	40	9	7
12	E	40	9	10
13	B	20	5	3.5
14	D	40	5	7
15	F	20	5	10
16	B	40	5	3.5
17	D	20	5	7
18	F	40	5	10
19	B	20	9	3.5
20	D	20	9	7
21	F	20	9	10
22	B	40	9	3.5
23	D	40	9	7
24	F	40	9	10

fase móvil se formó por gradiente con 800 mL agua con 1 mL ácido acético en la bomba B y 95 % de metanol en la bomba A. El programa comienza con 100 % de B y pasa a 95 % de A en 35 min; se mantiene por 5 min más y se regresa a la condición inicial. Se utilizó una columna de fase reversa C18 Dionex (Sunnyvale, CA) de 4.6 mm x 150 mm, con 5 µm de tamaño de partícula. Previo a la inyección, se realizó una dilución 1:10 de la muestra en etanol al 99.9 % en un matraz aforado de 10 mL, y fue filtrada a través de microfiltros de membrana de 0.45 µm de polifluoruro de vinilo (PVDF, Millipore Corp., Billington, MA).

Preparación de las emulsiones

Siguiendo la metodología de Monroy (2013), con algunas modificaciones, se prepararon pre-emulsiones, con azúcar (5 %) y sin azúcar, con un homogeneizador tipo rotor-estator UltraTurrax T-25 (IKA Werke, Stauffen, Alemania) a 15,000 rpm durante 5 min a 15 °C, mezclando lecitina de soya (0.5 %), Tween 20 (1.0 %), goma guar (0.25 %), concentrado de vainilla (33.5 %), glicerol (3.5, 7 y 10 %), y agua, de acuerdo con lo descrito en la Tabla 1. La emulsión final se preparó con

un homogeneizador de pistón de alta presión APV 1000 Lab Series (Crawley, West Sussex, UK). Las condiciones de trabajo se muestran en la Tabla 2.

Medición del tamaño de partícula

El tamaño medio de partícula de las emulsiones se determinó de acuerdo con lo descrito por Qian y McClements (2011), con algunas modificaciones, mediante dispersión de luz dinámica (DLS), utilizando un equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) en un ángulo detector fijo de 90°. Para minimizar los múltiples efectos de dispersión, antes de cada medición, las dispersiones se diluyeron usando un factor de dilución de 1:1000. Los resultados se describieron como el diámetro medio acumulado (expresado en nm) para el tamaño de partícula.

Estabilidad física

Para estudiar la estabilidad física de las emulsiones, se llevaron a cabo mediciones de retrodispersión (BS) a diferentes tiempos de almacenamiento, utilizando Turbiscan Lab Expert (Formulation, Toulouse, Francia) (Santos *et al.*, 2020). Los mecanismos de desestabilización fueron cuantificados por el Turbiscan Stability Index (TSI). Este índice es un valor estadístico y su valor se calcula como la suma de todos los procesos de desestabilización en la celda de medición y está definido por:

$$TSI = \sum_j |scan_{ref}(h_j) - scan_i(h_j)|$$

donde $scan_{ref}$ y $scan_i$ son el valor de transmisión inicial y el valor de transmisión en un momento específico, respectivamente, y h_j es una altura específica en la celda de medición.

Estabilidad de almacenamiento

La estabilidad de las nanoemulsiones se determinó midiendo el índice de estabilidad (TSI), diariamente durante el almacenamiento a 15, 25 y 35 °C durante 42 días.

Análisis estructural

Las muestras estudiadas por microscopía electrónica de transmisión fueron preparadas siguiendo el protocolo reportado por Lu *et al.* (2014), con modificaciones. Se agregaron 10 µL de emulsión en una rejilla de cobre cubierta con carbón durante 1 minuto; posteriormente, se hizo una tinción adicionando 10 µL de ácido fosfotúngstico a pH 7, secando la muestra a temperatura ambiente durante 1 h. La microestructura de las emulsiones se observó utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEOL TEM-1400 (JEOL, Ltd, Tokyo, Japón), alcanzando hasta 120 kV con una cámara de alta resolución Gatan ES1000W (Pleasantown, CA), de 11 megapíxeles y montaje lateral elevado. Las imágenes fueron manejadas en el software de control Digital Micrograph.

Análisis Estadístico

Todos los experimentos se realizaron por duplicado, y los datos se presentan como promedios ± desviación es-

tándar. El análisis estadístico se realizó mediante el software Minitab v. 16.1 (Minitab Inc., State College, PA). Se hizo un análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA), usando la prueba Tukey de rangos múltiples para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis cromatográfico

A partir de un extracto etanólico de vainilla y mediante un proceso de rota- evaporación se obtuvieron 15 L de concentrado de vainilla, el cual fue utilizado para la elaboración de las emulsiones. Los compuestos químicos presentes en el concentrado de vainilla se muestran en la Figura 1. Se identificaron cuatro componentes principales: el ácido *p*-hidroxibenzoico, el *p*-hidroxibenzaldehído, el ácido vainílico, y la vainillina con tiempos de retención de 26.7, 28.7, 29.3 y 30.6 minutos, respectivamente. Estos compuestos ya han sido previamente identificados y son característicos de *V. planifolia*. Además, son los responsables de proporcionar el sabor y aroma característico (Pérez-Silva *et al.*, 2006; Waliszewski *et al.*, 2007).

La Tabla 3 muestra las concentraciones de dichos compuestos, así como los parámetros de regresión lineal

obtenidos para las cuatro curvas de calibración realizadas previamente. El método HPLC utilizado para este estudio logró una adecuada separación entre los cuatro compuestos. La concentración de compuestos en el extracto etanólico de *V. planifolia* osciló entre 0.033 y 0.407 g/mL. En general, la concentración de vainillina resultó ser la más alta seguida por el ácido vainílico, el ácido *p*-hidroxibenzoico y el *p*-hidroxibenzaldehído (Tabla 3). Estos datos concuerdan con reportes previos, siendo la concentración del aldehído vainillina la que regularmente se encuentra en concentraciones más altas (Brunschwig *et al.*, 2009; Maruenda *et al.*, 2012; Ferrara, 2020).

Condiciones de procesamiento

De forma preliminar se elaboró una emulsión de vainilla para determinar las condiciones de presión y número de ciclos, que posteriormente serían evaluadas. La formulación constó de 10 % de concentrado de vainilla, 1 % de Tween 20, 0.5 % de lecitina de soya, 0.25 % de goma guar, y 30 % de glicerol. La influencia del número de ciclos y la presión sobre el tamaño de partícula, durante el procesamiento para el desarrollo de emulsiones se muestra en la Figura 2. Para investigar el efecto de la presión de homogeneización sobre el tamaño de partícula, la presión de homogeneización se va-

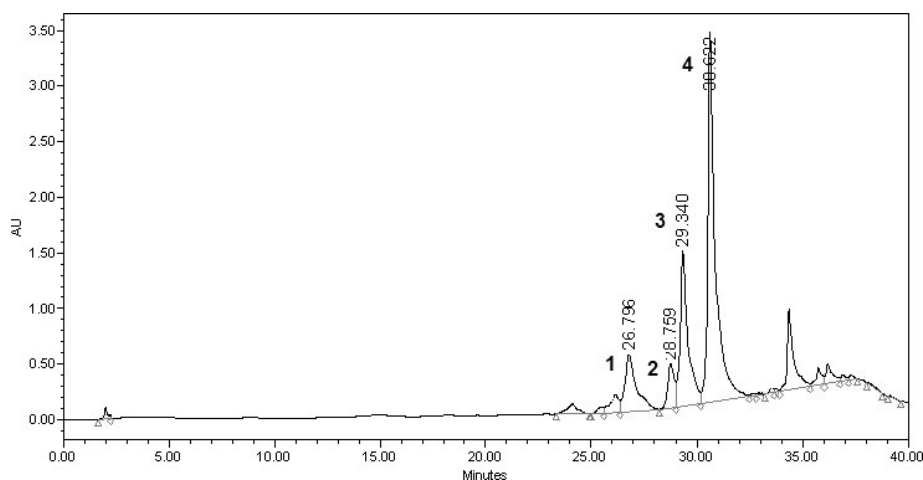


Figura 1. HPLC de fase reversa del extracto de *Vanilla planifolia* (1) ácido *p*-hidroxibenzoico; (2) *p*-hidroxibenzaldehído; (3) ácido vainílico; (4) vainillina.

Figure 1. Reversed-phase HPLC of a *Vanilla planifolia* extract (1) *p*-hydroxybenzoic acid; (2) *p*-hydroxybenzaldehyde; (3) vanillic acid; (4) vanillin.

Tabla 3. Concentración de los compuestos aromáticos encontrados en *Vanilla planifolia* utilizando HPLC.

Table 3. Concentration of the aromatic compounds in *Vanilla planifolia* using HPLC.

Compuesto	Tiempo de retención	Concentración (g mL ⁻¹)	Regresión lineal	
			$y = mx + b$	r^{2a}
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	26.7	0.045 ± 0.01	$5^{-10}x - 6^{-05}$	0.9999
<i>p</i> -hidroxibenzaldehído	28.7	0.033 ± 0.04	$2^{-10}x - 3^{-4}$	0.9983
Ac. Vainílico	29.3	0.139 ± 0.01	$8^{-10}x + 6^{-4}$	0.9988
Vainillina	30.6	0.407 ± 0.01	$3^{-10}x - 1^{-4}$	0.9995

^a Coeficiente de correlación

Los datos están expresados como la media y ± error estándar.

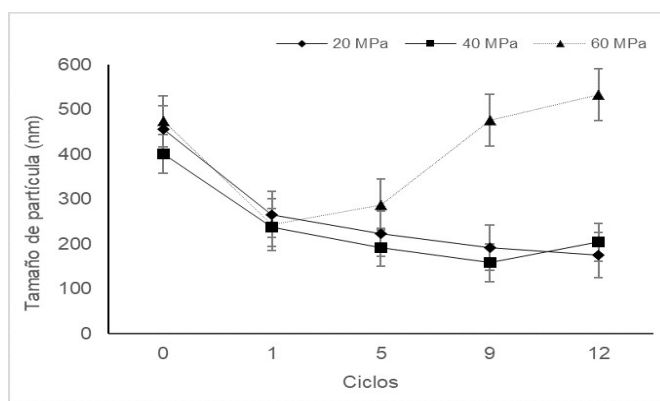


Figura 2. Influencia del número de ciclos sobre el tamaño de partícula en la emulsión de vainilla.

Figure 2. Influence of the number of cycles on the particle size of the vanilla emulsion.

rió de 20 a 60 MPa, y el número de ciclos evaluado fue hasta 12. El tamaño de partícula disminuyó cuando la presión aumenta, mostrando comportamientos similares a 20 MPa y 40 MPa. La disminución del tamaño de partícula se debe a que la energía aportada por el proceso de homogeneización fue suficiente para reducir el tamaño de las gotas (Håkansson, 2018). Los tamaños medios de partícula más pequeños a las presiones más grandes son una consecuencia de las tensiones de cizallamiento más altas, representando más energía, mayor turbulencia, e induciendo una tasa de disrupción más alta (Marie *et al.*, 2002; Kotta *et al.*, 2015; Hidajat *et al.*, 2020).

Las emulsiones de vainilla procesadas a 20 MPa con 5 y 9 ciclos mostraron tamaños de partícula de 184.2 y 154 nm, respectivamente, siendo estos los valores de tamaño de partícula más bajos logrados. Sin embargo, se observó un aumento significativo de tamaño de partícula a 60 MPa a partir del ciclo 5, aumentando de 230 hasta 526.7 nm. También, de manera similar se observó un aumento en el tamaño de partícula de la emulsión procesada a 40 MPa en el ciclo 12, mostrando un tamaño de 263 nm. Estos aumentos en el tamaño de partícula a presiones y ciclos más altos, puede deberse al fenómeno denominado sobreprocesamiento o recoalescencia (Qian y McClements, 2011; Hakansson, 2018). Esto se ha informado anteriormente en otros estudios: Ali *et al.* (2016), obtuvieron tamaños de gotas de hasta 200 nm de una nanoemulsión estabilizada con β -lactoglobulina (β -lg), cuando se aplicó una presión de homogeneización de 100 MPa, durante 4 ciclos. Sin embargo, la eficiencia de emulsificación de β -lg se redujo a presiones de homogeneización más altas (200 MPa y 300 MPa). Por su parte, Santos *et al.* (2020), desarrollaron emulsiones de aceite esencial de mandarina estabilizado por dos surfactantes de grado alimenticio (Tween 80 y Span 80), y goma guar, y encontraron que los diámetros de las gotas cambiaron hacia tamaños más grandes de uno a dos ciclos, independientemente de la presión de homogeneización, siendo 25000 psi y un ciclo, los que aportaron la energía suficiente para obtener nanoemulsiones de 192 nm y evitar el fenómeno de sobreprocesamiento.

Existen diversos motivos relacionados con el sobreprocesamiento; los principales están relacionados con la concentración y tasa de adsorción del emulsionante, ya que el área de superficie de las gotas aumenta drásticamente durante la homogeneización a elevadas presiones, y la concentración del emulsionante debería ser suficiente para cubrir toda la interfaz y su tasa de adsorción más alta para evitar la coalescencia, y por lo tanto el aumento en el tamaño de partícula (Jafari *et al.*, 2007).

En este estudio, se encontró que las mejores condiciones de procesamiento para la emulsión de vainilla, de acuerdo con los valores de tamaños de partícula más bajos se encuentran en el rango de los 20 a 40 MPa, y de 5 a 9 ciclos, por lo que estas condiciones fueron elegidas para el resto de los experimentos.

Estabilidad física

Para evaluar la estabilidad de las nanoemulsiones con y sin azúcar se determinó el índice de estabilidad. Las emulsiones fueron preparadas de acuerdo a la formulación y procesamiento que se encuentra descrito en la Tabla 2. Cada punto en la Figura 3 representa una cinética de 7 días para cada emulsión. Los resultados muestran diferencia significativa entre las emulsiones evaluadas. Se observó una mayor influencia sobre la estabilidad, por el número de ciclos probados y la concentración de glicerol. La estabilidad se vio afectada con la disminución de la concentración de glicerol y el aumento de ciclos en el procesamiento. La emulsión 11 fue la menos estable, mientras que las que mostraron mayor estabilidad fueron las emulsiones 1 y 8. Sin embargo, la emulsión 1 se descartó para la siguiente evaluación, debido a que exhibió floculación.

El efecto de la formulación y procesamiento en la estabilidad de las emulsiones sin azúcar se observa en la Figura 4. En las emulsiones sin azúcar, la concentración de glicerol ejerció un papel importante en la estabilidad. La emulsión menos estable fue la 19 y las de mayor estabilidad, las 14, 20 y 21. Las emulsiones más estables fueron las formuladas con

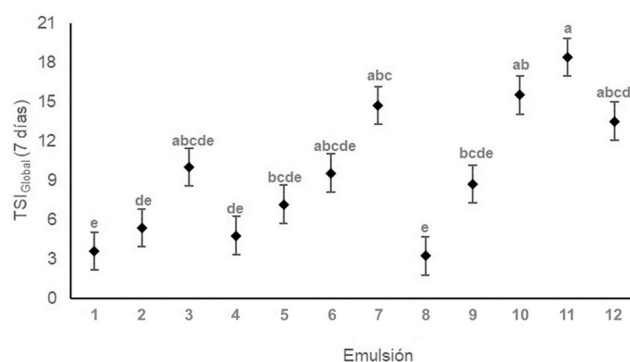


Figura 3. TSI_{global} a los 7 días de almacenamiento, en función de las diferentes formulaciones de vainilla con azúcar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las emulsiones a $P < 0.05$

Figure 3. TSI_{global} at 7 days of storage as a function of the different emulsion formulations of vanilla with sugar. Different letters indicate significant difference between emulsions at $P < 0.05$

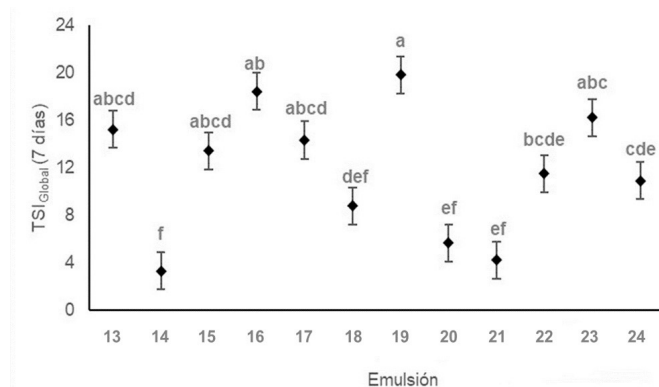


Figura 4. TSI_{global} a los 7 días de almacenamiento, en función de las diferentes formulaciones de vainilla sin azúcar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las emulsiones a $P < 0.05$

Figure 4. TSI_{global} at 7 days of storage as a function of the different emulsion formulations of vanilla without sugar. Different letters indicate significant difference between emulsions at $P < 0.05$

mayor concentración de glicerol (7 y 10 %); esto puede deberse a que al aumentar la concentración de glicerol se produce un cambio en la viscosidad, retardando la difusión de las moléculas del soluto a través de la solución, que promueve la estabilidad; es decir se favorece la formación de sistemas mono-dispersos (McClements, 2004; Chanasattru, 2009). Qian y McClements (2011), modificaron la concentración de glicerol de la fase continua, encontrando una reducción de tamaño al incrementar la concentración de glicerol obteniendo tamaños de hasta 80 nm. Hamed y Abo-Elwafa (2020), reportaron que la viscosidad de la fase continua aumentó al incrementar la concentración de glicerol; sin embargo, este no afectó significativamente las características de la nanoemulsión producida. Tales variaciones en los resultados fueron atribuidas a las diferencias en el tipo de emulsionantes o en el equipo de homogeneización utilizado.

Estabilidad de almacenamiento

Para investigar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la emulsión, las emulsiones 8, 12, 14 y 23 fueron elegidas como las mejores, y fueron almacenadas a 15, 25 y 35 °C, durante 42 días. Los cambios en el índice de estabilidad de las nanoemulsiones de vainilla durante el almacenamiento se muestran en la Figura 5, donde el valor de TSI alto corresponde al sistema más inestable. El índice de estabilidad aumentó durante los 42 días a las tres temperaturas de almacenamiento. Las emulsiones fueron más estables a temperaturas más bajas. Es sabido que la tensión superficial de la mayoría de los líquidos disminuye al aumentar temperatura (Chen y Tao, 2005; Li y Lu, 2016). En sistemas que no están en equilibrio, las emulsiones tienden a reducir sus áreas interfaciales y la energía libre a través de varios procesos de descomposición, como cremado, sedimentación, floculación, maduración de Ostwald y coalescencia (Chantrapornchai *et al.*, 2001; Karthika *et al.*, 2017).

En el presente estudio, la emulsión 8, almacenada a 15 °C y 25 °C fue más estable durante los 42 días, mientras que a 35 °C, en el día 21 hubo un incremento de tamaño de

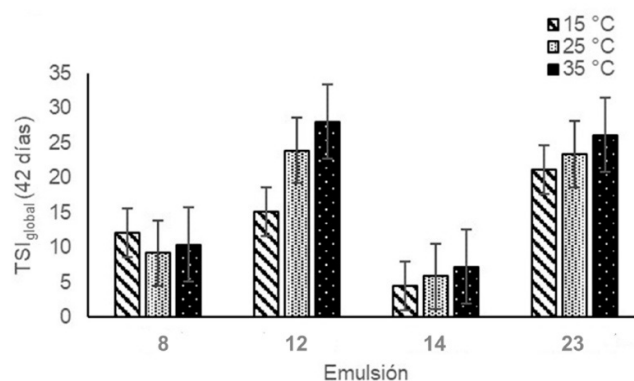


Figura 5. Efecto de la temperatura sobre la TSI_{global} de las emulsiones con y sin azúcar, durante un almacenamiento de 42 días. Letras diferentes en el gráfico indican diferencia significativa entre temperaturas a $P < 0.05$.

Figure 5. Effect of temperature on the TSI_{global} of the emulsions with and without sugar, during a storage of 42 days. Different letters in the graphs indicate significant difference between temperatures at $P < 0.05$.

partícula (datos no mostrados). En la emulsión 14, ocurrió el mismo efecto de inestabilidad que en la emulsión con azúcar a 35 °C, ocurriendo este a los 28 días de almacenamiento; las emulsiones a 15 y 25 °C no manifestaron algún fenómeno de inestabilidad durante el tiempo de almacenamiento.

Microscopía

El estudio morfológico de las emulsiones más estables (8 y 14) se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los resultados de TEM permitieron demostrar la formación de las nanoemulsiones y validar los diámetros medios de gota alcanzados. En la emulsión 8 (Figura 6A), se observan estructuras casi esféricas con tamaños de partícula que van de 0.14 μm a 0.86 μm, mientras que para la emulsión 14 (Figura 6B), se observan tamaños de gota de 0.14 μm a 0.77 μm. Estos resultados muestran similitud con los tamaños que fueron alcanzados por la homogeneización de altas presiones y medidos por dispersión de luz dinámica (Figura 2). Dichos valores se encuentran en el rango de 20 a 500 nm, característico de las nanoemulsiones (Ho *et al.*, 2021). En ambas emulsiones se observaron floculos creándose aglomerados; esto indica que probablemente la emulsión tienda a desarrollar sedimentación inversa al pasar los días.

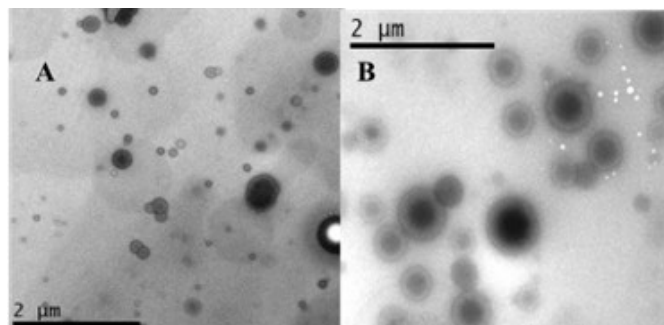


Figura 6. Imágenes de las emulsiones de vainilla obtenidas por un Microscopio electrónico de transmisión. (A) Emulsión 8; (B) Emulsión 14.

Figure 6. Transmission electron microscopy photographs of vanilla emulsions. (A) Emulsion 8; (B) Emulsion 14.

CONCLUSIÓN

El presente estudio confirmó que la estabilidad de la emulsión de vainilla se vio influenciada por la presión de homogeneización y el número de ciclos, así como la formulación de la misma. Se observó que el proceso en un rango de presión entre 20 y 40 MPa, es adecuado para evitar el sobreprocesamiento. El incremento en la concentración de glicerol también permitió disminuir el tamaño de partícula y aumentar la viscosidad, contribuyendo con ello en la estabilidad en ambas emulsiones. Una de las observaciones más importantes que se destaca es la estabilidad que le proporcionan el azúcar y el glicerol a las emulsiones, permitiendo extender su tiempo de almacenamiento hasta 42 días con temperaturas menores a 25 °C. Estos hallazgos podrían facilitar su aplicación en diferentes matrices alimentarias, utilizando las nanoemulsiones como una estrategia para preparar ingredientes bioactivos más estables y dispersables en diferentes medios.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del Tecnológico Nacional de México, por el financiamiento bajo el convenio 6229.17-P, y al CONACyT por la beca de estudios de posgrado.

REFERENCIAS

- Ali, A., Mekhloufi, G., Huang, N. y Agnely, F. (2016). β -lactoglobulin stabilized nanemulsions—Formulation and process factors affecting droplet size and nanoemulsion stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 500(1–2), 291–304. <https://doi.org/10.1016/j.jipharm.2016.01.035>
- Anton, N., Benoit, J. P. y Saulnier, P. (2008). Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. *Journal of Controlled Release*, 128(3), 185–199. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.02.007>
- Brunschwig, C., Collard, F. X., Bianchini, J.-P. y Raharivelomanana, P. (2009). Evaluation of Chemical Variability of Cured Vanilla Beans (*Vanilla tahitensis* and *Vanilla planifolia*). *Natural Product Communications*, 4(10), 1934578X0900401. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900401016>
- Chanasattru, W., Decker, E. A. y McClements, D. J. (2009). Influence of glycerol and sorbitol on thermally induced droplet aggregation in oil-in-water emulsions stabilized by β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.02.004>
- Chantrapornchai, W., Clydesdale, F. M. y McClements, D. J. (2001). Influence of relative refractive index on optical properties of emulsions. *Food Research International*, 34(9), 827–835. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00105-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00105-3)
- Chen, G. & Tao, D. (2005). An experimental study of stability of oil-water emulsion. *Fuel Processing Technology*, 86(5), 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2004.03.010>
- Ferrara, L. (2020). Medicinal and pharmaceutical properties of *Vanilla planifolia*. *International Journal of Medicinal Reviews*, 7(1), 25–29. <https://doi.org/10.30491/IJMR.2020.222917.1081>
- Gonzalez-Arno, M. T., Lazaro-Vallejo, C. E., Engelmann, F., Gamez-Pastrana, R., Martinez-Ocampo, Y. M., Pastelin-Solano, M. C. y Diaz-Ramos, C. (2009). Multiplication and cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 45(5), 574–582. <https://doi.org/10.1007/s11627-009-9242-6>
- Håkansson, A. (2018). Fabrication of Nanoemulsions by High-Pressure Valve Homogenization. In S. M. Jafari y D. J. McClements (Eds.), *Nanoemulsions* (pp. 175–206). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00007-2>
- Hamed, S. F. y Abo-Elwafa, G. A. (2020). Preparation of novel nanoemulsions from omega-3 rich oil. *Grasas y Aceites*, 71(2), 350. <https://doi.org/10.3989/gya.0229191>
- Hidajat, M. J., Jo, W., Kim, H. y Noh, J. (2020). Effective Droplet Size Reduction and Excellent Stability of Limonene Nanoemulsion Formed by High-Pressure Homogenizer. *Colloids and Interfaces*, 4(1), 5. <https://doi.org/10.3390/colloids4010005>
- Ho, T. M., Abik, F. y Mikkonen, K. S. (2021). An overview of nanoemulsion characterization via atomic force microscopy. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–21. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1879727>
- Jafari, S. M., He, Y. y Bhandari, B. (2007). Optimization of nanoemulsions production by microfluidization. *European Food Research and Technology*, 225(5–6), 733–741. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0476-9>
- Jafari, S. M., Paximada, P., Mandala, I., Assadpour, E. y Mehrnia, M. A. (2017). Encapsulation by nanoemulsions. In S. M. Jafari (Ed.), *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries* (pp. 36–73). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809436-5.00002-1>
- Karthik, P., Ezhilarasi, P. N. y Anandharamakrishnan, C. (2017). Challenges associated in stability of food grade nanoemulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(7), 1435–1450. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1006767>
- Khoyratty, S., Kodja, H. y Verpoorte, R. (2018). Vanilla flavor production methods: A review. *Industrial Crops and Products*, 125, 433–442. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.028>
- Kotta, S., Khan, A. W., Ansari, S. H., Sharma, R. K. y Ali, J. (2015). Formulation of nanoemulsion: a comparison between phase inversion composition method and high-pressure homogenization method. *Drug Delivery*, 22(4), 455–466. <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.866992>
- Kralova, I. y Sjöblom, J. (2009). Surfactants Used in Food Industry: A Review. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 30(9), 1363–1383. <https://doi.org/10.1080/01932690902735561>
- Li, P.-H. y Lu, W.-C. (2016). Effects of storage conditions on the physical stability of d-limonene nanoemulsion. *Food Hydrocolloids*, 53, 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.031>
- Lu, W.-C., Chiang, B.-H., Huang, D.-W. y Li, P.-H. (2014). Skin permeation of d-limonene-based nanoemulsions as a transdermal carrier prepared by ultrasonic emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(2), 826–832. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.10.013>
- Marie, P., Perrier-Cornet, J. M. y Gervais, P. (2002). Influence of major parameters in emulsification mechanisms using a high-pressure jet. *Journal of Food Engineering*, 53(1), 43–51. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(01\)00138-8](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00138-8)
- Maruenda, H., Vico, M. D. L., Householder, J. E., Janovec, J. P., Cañari, C., Naka, A. y Gonzalez, A. E. (2013). Exploration of *Vanilla pompona* from the Peruvian Amazon as a potential source of vanilla essence: Quantification of phenolics by

- HPLC-DAD. *Food Chemistry*, 138(1), 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.037>
- McClements, D. J. 2004. Emulsions Ingredients. In D. J. McClements (Ed.), *Food emulsions: principles, practices, and techniques* (pp. 36–73). Elsevier Inc.
- Monroy, J. A. (2013). Formulación de una emulsión estable de concentrado de vainilla libre de alcohol y proceso de obtención del mismo. México. (Patente MX2013014920A).
- Official Methods of Analysis (1995) 16th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Arlington, VA, sees 955.31, 964.10,966.12, 966.13,990.25
- Pérez-Silva, A., Odoux, E., Brat, P., Ribeyre, F., Rodriguez-Jimenes, G., Robles-Olvera, V., García-Alvarado, M. A. y Günata, Z. (2006). GC–MS and GC–olfactometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans. *Food Chemistry*, 99(4), 728–735. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.050>
- Qian, C. y McClements, D. J. (2011). Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1000–1008. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.09.017>
- Salem, M. A. y Ezzat, S. M. (2019). Some New Aspects of Colloidal Systems in Foods. In J. M. Milani (Ed.), *Nanoemulsions in Food Industry*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75145>
- Santos, J., Calero, N., Trujillo-Cayado, L. A., Martín-Piñero, M. J. y Muñoz, J. (2020). Processing and Formulation Optimization of Mandarin Essential Oil-Loaded Emulsions Developed by Microfluidization. *Materials*, 13(16), 3486. <https://doi.org/10.3390/ma13163486>
- Sostaric, T., Boyce, M. C. y Spickett, E. E. (2000). Analysis of the volatile components in vanilla extracts and flavorings by solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), 5802–5807. <https://doi.org/10.1021/jf000515+>
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J. y Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108–109, 303–318. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>
- Waliszewski, K. N., Pardio, V. T. y Ovando, S. L. (2007). A simple and rapid HPLC technique for vanillin determination in alcohol extract. *Food Chemistry*, 101(3), 1059–1062. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.004>
- Yalçınöz, Ş. y Erçelebi, E. (2018). Potential applications of nano-emulsions in the food systems: An update. *Materials Research Express*, 5(6). <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aac7ee>



Performance of *Litopenaeus vannamei* at different levels of daily protein intake and carbohydrate/protein ratios in low fishmeal content feeds

Rendimiento de *Litopenaeus vannamei* a diferentes niveles de ingesta diaria de proteína y proporciones carbohidrato/proteína en alimentos formulados con baja inclusión de harina de pescado

Ruvalcaba Márquez Juan Carlos¹, Eliza Martínez Antonio¹, Píndaro Álvarez Ruíz², Ramón Casillas Hernández³, Humberto Mejía Ruíz¹, *Francisco Javier Magallón Barajas¹

¹ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

² Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Instituto Politécnico Nacional.

³ Instituto Tecnológico de Sonora.

ABSTRACT

The increase in shrimp aquaculture production relates to the development of increasingly efficient formulated feeds and feed management strategies. Protein, considered the most important ingredient in feeds, represent the highest economic and environmental cost. Therefore, determining the appropriate amount of protein is essential to maintain a balance between performance, cost, and environment in aquaculture systems. The objective of this study was to determine the mathematical functions of Daily Protein Intake (DPI), to evaluate feeds with different Carbohydrate/ Crude protein (CBH:CP) ratio and low inclusion of fishmeal for *L. vannamei* juveniles culture. The adjusted mathematical function that best represented aquaculture feeding practices was $DPI=44.7(BW)^{-0.714}$. In the first experiment, four variants of DPI (80, 100, 120 and 140 %) at a constant CBH:CP ratio was carried out, finding the best performance at 120 %. In the second experiment, diets with five levels of CBH:CP (g CBH: g crude protein; 2.1, 1.5, 1.1, 0.8 and 0.6) with constant Lip:CP were evaluated using the same DPI function. The CBH:CP levels variation had a significant effect on growth parameters, feed conversion rate, nitrogen retention and protein, determining that feed with 2.1 CBH:CP ratio presents the best results when using $DPI=53.64(BW)^{-0.714}$.

Keywords: Daily protein intake, nitrogen retention, *L. vannamei* performance, carbohydrates:protein rates.

RESUMEN

El aumento de la producción acuícola de camarón se ha logrado gracias al desarrollo de alimentos balanceados y estrategias de alimentación más eficientes. La proteína es considerada el insumo más importante para el desarrollo de los organismos, y representa el mayor costo económico y ambiental. El objetivo de este estudio fue determinar las funciones matemáticas de ingesta diaria de proteína (IDP), con objeto de utilizarlas para evaluar dietas con diferentes proporciones de carbohidratos/proteína cruda (CHO:CP) y baja inclusión de harina de pescado en juveniles de *L. vannamei*. El modelo matemático que representó de mejor manera las prácticas de alimentación acuícolas evaluadas fue $IDP=44.7(PC)^{-0.714}$. En el primer experimento se utilizaron

cuatro niveles de variación de IDP (80, 100, 120 y 140 %) a una proporción CHO:CP constante, encontrando el mejor rendimiento con IDP 120 %. En el segundo experimento; se evaluaron dietas con cinco niveles de CHO:CP (g CHO:g proteína cruda; 2.1, 1.5, 1.1, 0.8 y 0.6) usando la mejor función de IDP. La variación de los niveles de CHO:CP tuvieron un efecto significativo en crecimiento, el factor de conversión alimenticia, retención de nitrógeno y eficiencia proteica, determinando que la dieta con CHO:CP de 2.1 presentó mejores resultados con $IDP=53.64(PC)^{-0.714}$.

Palabras clave: Ingesta diaria de proteína, retención de nitrógeno, desempeño de *L. vannamei*, proporción carbohidrato: proteína.

INTRODUCTION

Shrimp aquaculture production has shown an accelerated increase in the last two decades, reaching 4.966 million tons in 2018 for *L. vannamei*, corresponding to 54 % of crustacean aquaculture (FAO, 2020). These production levels have been possible thanks to the culture intensification, where the use of formulated feeds and feed management has been a fundamental strategy (Wasielesky *et al.*, 2006). Shrimp feed quality include protein, fatty acids, carbohydrates, vitamins, minerals, and additives (Wang *et al.*, 2015). Protein is one of the most important nutrients required for growth (Hu *et al.*, 2008) and accounts the major economic and environmental cost in diets formulation, favoring the increase of nitrogen residuals to the environment (Tacon and Akiyama, 1997; Lee and Lee, 2018; Gil-Nuñez *et al.*, 2020). The proper use of protein favors rapid growth (Guroy *et al.*, 2012) and water quality in aquaculture systems (Limsuwan and Junratchakoo, 2004). A minimum dietary protein level is required to supply amino acids for normal maintenance of metabolism (Lee and Lee, 2018). Several studies have evaluated the adequate protein requirements in terms of protein levels in feeds, finding the best yields feeding with 36 % (Yaemssoksawat *et al.*, 2008) and 40 % (Liu *et al.*, 2005). Kureshy and Davis (2002) determined the daily protein intake (g DP kg⁻¹ BW d⁻¹) for maintenance and maximum growth for *L. vannamei* juveniles at different body weights (g) and protein retentions. In addition

to protein, the development of aquaculture systems requires a precise evaluation for the rest of the energy substrates.

The protein in the diet can be reduced if the energy required comes from another source such as carbohydrates or lipids, which can reduce the emission of residual nutrients and feed costs (Zainuddin *et al.*, 2014). Shrimp require lipids in their diet to perform a series of metabolic functions, where the recommended lipid levels in the diet range between 6 and 10 %, with negative effects on growth with values greater than 10 % (González-Félix *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2017; Jannalhulla *et al.*, 2019). Zhang *et al.* (2013) determined that the effect of lipids could vary depending on the protein, reporting highest growth rates at high inclusion percentages in diets with 34 % protein. Despite the low digestibility of carbohydrates by the shrimp (Shiau, 1997), carbohydrates are often used in formulated feeds as an energy source through the protein-sparing mechanism (Wang *et al.*, 2015), where feeding with frequency of four times per day, diets carbohydrate-rich presents a good performance (Zainuddin *et al.*, 2014).

The importance of protein amount provided is clear in aquaculture, also related to other different nutrients in the feeding of shrimp. On the other hand, there is a lack of studies related to the growth of *L. vannamei* with fixed amounts of protein anchored to different ratios of other nutrients. Thus, the aim of this study was to determine the daily protein intake (DPI) mathematical functions related to body weight, in order to use in experiments to evaluate carbohydrate:crude protein ratios in feeds with low inclusion of fishmeal that present the best performance in terms of growth, protein efficiency and nitrogen retention. The use of mathematical functions for the supply of protein will favor the use of the appropriate amount of this, reducing economic and environmental costs while maintaining good performance, allowing evaluate feed formulas and variation of other energetic substrates such as carbohydrates.

MATERIAL AND METHODS

Shrimp feeding tables

Different shrimp feeding tables reported for *L. vannamei* aquaculture in several countries or recommended by relevant feed companies were reviewed. Feeding tables used in this study were based on biomass percentages (%Biomass) for different shrimp Body Weights (g).

DPI mathematical model

Daily protein intake (g protein/kg biomass/day) mathematical function related to *L. vannamei* Body Weight (BW) in grams, was adjusted in this study from experimental data reported by Kureshy and Davis (2002), using selected DPI data for different BWs where Protein Retention (%) was similar (37.2 % in average).

Data from different feeding tables reviewed in this study were transformed to Daily Protein Intake DPI (g protein /Kg Biomass/day) related to individual BW and were analyzed to determine the best fit for mathematical functions between

both variables, using the same mathematical model mentioned previously. The best fit for DPI mathematical function for all the data reported for *L. vannamei* in an explicit or implicit manner (through feeding tables) was $DPI=a(BW)^b$, where DPI is expressed in g protein/Kg biomass/day and BW in grams.

The mathematical function adjusted from data reported by Kureshy and Davis (1992) was considered as 100 % DPI, and four functions were developed as a variation in 20 % between them (80, 100, 120 and 140 %) to cover the explicit or implicit DPI data reviewed for *L. vannamei* aquaculture at different body weights. These mathematical functions were evaluated experimentally at different levels of DPI and same BW respect to growth, protein efficiency and nitrogen retention using feeds with fixed carbohydrate: crude protein (CBH:CP) and lipid:crude protein (Lip:CP) ratio.

First trial: DPI mathematical functions related to 80, 100, 120, 140 % DPI levels

The experiment was carried out in the experimental nutrition laboratory at the Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (La Paz, Baja California Sur, México). *L. vannamei* juveniles (1 ± 0.5 g) from Aquacultura Mahr local company, kept under laboratory conditions for one week, were randomly distributed in three experimental units (60 L fish tanks) ($n=12$) for each DPI level. Shrimp were reared under controlled conditions of salinity 37 ± 0.5 psu (practical salinity units), dissolved oxygen (6 ± 1.0 mg O₂ L⁻¹), temperature (28 ± 1 °C) and photoperiod (12:12h light:dark).

Shrimp were fed with a commercial diet (40 % protein and fixed CBH:CP ratio) in four daily rations (9:00, 12:00, 15:00 and 18:00 h) to decrease the amount of feed not eaten according to four DPI levels (80, 100, 120 and 140 %) for 35 days. The DPI levels were adjusted weekly according to the shrimp body weight and biomass. The shrimp tanks were siphoned every day to remove uneaten food, with a weekly water exchange (80 %), to remove organic carbon, nitrogen and phosphorous residuals accumulated during the week. Also, the experimentally selected DPI mathematical function was used to evaluate five experimental low fishmeal feeds with different CBH:CP ratios using the same Lipid:Crude protein level and DPI mathematical function.

Formulated diets

For the second experiment, five diets were formulated with Nutrion® software, using a low inclusion of fish meal (6.5 %; table 1), yeast and soybean meal as protein, sardine oil for lipids and wheat flour as carbohydrate source, to obtain five CBH:CP (2.1, 1.5, 1.1, 0.8 and 0.6) ratios with the same Lip:CP ratio (table 1). The ingredients were ground in an ultrafine sprayer set at 250 µm and mixed with water and a fermented mix of marine yeasts and lactobacilli selection. Once extruded and dried, the diets were subjected to two steps of organic acid and fish oil baths. Table 2 shows the proximal composition of the diets.

Table 1. Diets composition formulated with five different carbohydrate:protein (crude protein) (CBH:CP) ratios with same lipid:protein (Lip:CP) ratio for *L. vannamei*. Ingredients are expressed in dry weight (%).

Tabla 1. Composición de dietas formuladas con cinco proporciones diferentes carbohidrato:proteína (proteína cruda) (CHO:CP) con la misma proporción lipido:proteína (Lip:CP) para *L. vannamei*. Los ingredientes se expresan en base seca.

Diet	1	2	3	4	5
CBH:CP	2.1	1.5	1.1	0.8	0.6
Lip:CP	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Wheat meal	51.4	37.4	23.6	16.6	8.4
SPC ¹	0	0	10	32.4	49.1
Soybean meal	21.9	36	36.8	20.4	11.5
Fishmeal	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
Fish oil	0.7	1	1.5	1.8	2.2
Yeast ²	4	4	4.5	4.5	4.5
PM vit ³	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6
PM min ⁴	6.3	6.1	5.8	5.9	5.7
Soybean lecithin	2.4	3.1	3.8	4.4	5
Aminoacids mix ⁵	0.4	0.14	0.3	0.3	0.5
Alginate acid	2	2	2	2	2
Probiotic Mix ⁶	1	1	1	1	1
Cellulose	0.8	0.16	1.6	1.6	1
	100	100	100	100	100

1.- Soybean protein concentrate, 2.- *Saccharomyces cerevisiae*, 3.- Choline, DL-alpha-tocopherol, retinol, butylated hydroxytoluene, astaxanthin, ascorbic acid, biotin, inositol, folic acid, cholecalciferol, menadione, thiamine, riboflavin, niacin, pantothenic acid, pyridoxine, cobalamin, carnitine. 4.- NaH₂PO₄, CaCO₃, KH₂PO₄, MgSO₄-7H₂O, ZnSO₄-7H₂O, CuSO₄-7H₂O, CoCl₂, Na₂SeO₃, KI. 5.- Methionine, arginine, tryptophane. 6.- Formic, propionic, acetic and citric acid.

Second trial: Different levels of CBH:CP ratio using same DPI model

L. vannamei juveniles (2.5 ± 0.5 g) were randomly distributed in 15 experimental tanks with 60 L (12 organisms per aquarium) by triplicate. The feeding was based on the DPI mathematical function selected in the first trial. The shrimp tanks were daily siphoned to remove uneaten feed, with a weakly water exchange (40 %) and environmental conditions like the experiment mentioned above.

Statistical analysis

The following zootechnical parameters were obtained in both experiments: Weight gain (%) (WG) = ((final weight (g) – initial weight (g))*100)/ initial weight (g); Specific growth rate (%) (SGR) = 100 * (ln final weight (g) – ln initial weight (g))/days of experiment; Survival rate (%) = ((shrimp initial number – dead shrimp number)/shrimp initial number) × 100; Feed conversion ratio (FCR) = feed intake (dry matter) (g)/weight gain (g); Protein efficiency ratio (PER) = wet weight gain (g) / dry protein intake (g).

Homoscedasticity of variances and normality of data were verified by Bartlett and Shapiro Wilk's test. The effect of DPI in the first experiment and dietary CBH:CP in the second one on zootechnical parameters was analyzed separately using one way ANOVA. Differences were considered significant at $p < 0.05$ and were indicated to the end of the tables. Differences between means for each group (individual means) were determined using a post hoc Tukey's HSD test.

RESULTS

Feeding tables review

In all the shrimp feeding tables reviewed the daily ration based on biomass (%) diminish as the Body Weight increase. A greater variability in DPI was found in the feeding ratio based on Biomass percentage for shrimps with BW lower than 5 grams in all analyzed cases; from BW 5 to 12 grams most cases show similar DPI levels. Feeding tables reported for México by Quintero and Roy (2010) and for Honduras by Teichert-Coddington and Rodriguez (1995) show greater feeding ratios from 2 to 18 grams compared to other feeding tables (figure 1).

Table 2. Proximate chemical analysis for formulated diets with five different carbohydrate:protein (crude protein) (CBH:CP) and same lipid:protein (Lip:CP) ratio for *L. vannamei*.

Tabla 2. Análisis químico proximal de dietas formuladas con cinco proporciones diferentes de carbohidrato:proteína (proteína cruda) (CHO:CP) con la misma proporción lipido:proteína (Lip:CP) para *L. vannamei*.

Diet	CBH:CP (g/g)	Lip:CP (g/g)	Moisture (%)	Crude protein (%)	Crude lipids (%)	Crude fiber (%)	Ash (%)	NFE (%)	Energy (cal/g)
0	1.07	0.2	6.4±0.1	40.4±0.2	8.1±0.1	1.0±0.1	7.2±0.04	43.3	4809.6±3.1
1	2.1	0.2	8.8±0.10	26.5±0.24	5.1±0.03	0.4±0.10	10.0±0.01	57.9	4091±0.61
2	1.5	0.2	11.5±0.1	32.7±0.1	6.3±0.1	0.6±0.00	10.8±0.1	49.6	4276.8±3.9
3	1.1	0.2	9.1±0.1	37.9±0.1	7.5±0.1	1.0±0.1	10.6±0.1	42.9	4398.1±6.1
4	0.8	0.2	11.2±0.1	42.2±0.1	8.5±0.03	1.8±0.0	10.34±0.1	37.1	4488.0±4.8
5	0.6	0.2	9.7±0.1	46.1±0.1	9.1±0.1	0.7±0.1	10.2±0.01	33.8	4608.1±1.2

Diet 0: Commercial Feed for First trial, diets 1-5: Experimental formulated feeds for second trial.

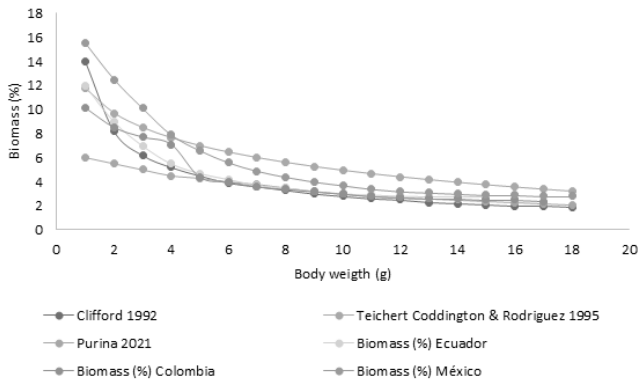


Figure 1. Feeding rates as % Biomass related to shrimp *L. vannamei* body weight (g) for different cases reported by Clifford (1992) and Teichert Coddington and Rodríguez (1995) for Honduras, Davis et al. (2006) para Nicovita, Quintero and Roy (2010) for Ecuador, Colombia and México, Purina 2021 https://www.nutrimentospurina.com/archivos_aplicaciones/files_fkceditor/file/Acuacultura/Guia_Alimentacion.pdf
Figura 1. Tasas de alimentación en porcentaje de biomasa en función del peso corporal (g) del camarón *L. vannamei* para diferentes casos analizados que incluyen datos reportados por; Clifford (1992) y Teichert Coddington and Rodríguez (1995) para Honduras, Davis et al (2006) para Nicovita, Quintero y Roy (2010) para Ecuador, Colombia y México, Purina 2021 https://www.nutrimentospurina.com/archivos_aplicaciones/files_fkceditor/file/Acuacultura/Guia_Alimentacion.pdf

DPI mathematical functions related to body weight (BW)

The DPI mathematical function developed in this study from experimental data reported by Kureshy and Davis (2002) with similar protein efficiency levels, was $DPI = 44.7 BW^{0.714}$ (Figure 2).

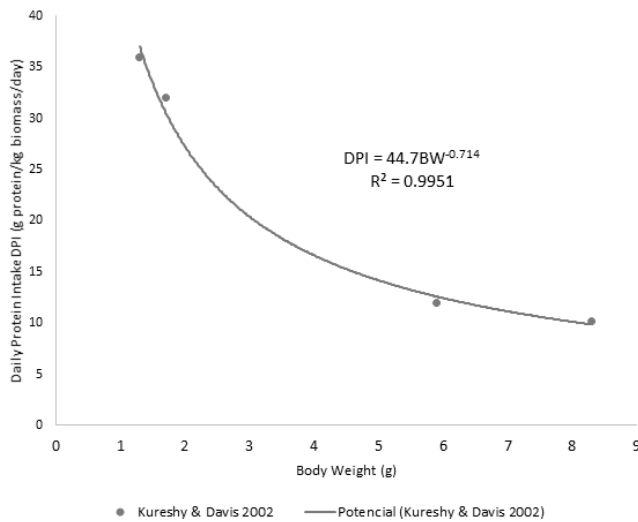


Figure 2. Daily protein intake (g prot/kg biomass/day) mathematical function ($DPI=44.7(BW)^{0.714}$) related to *L. vannamei* Body weight (BW) in grams, obtained in this study from experimental data reported by Kureshy and Davis (2002), using selected DPI data for different shrimp sizes only where protein retention (%) was similar (37.2 % in average).
Figura 2. Función matemática de la Ingesta Diaria de Proteína (g prot/ kg biomasa / día), $IDP=44.7PC^{0.714}$, en función del peso corporal (PC) en gramos, obtenida en este estudio a partir de datos experimentales reportados por Kureshy and Davis (2002), utilizando datos de IDP seleccionados para diferentes pesos corporales donde la retención de proteína (%) fue similar (37.2 % en promedio).

Figure 3 show the DPI mathematical functions adjusted from transformed data obtained from the different feeding tables, compared with the DPI mathematical function reported in figure 2.

DPI mathematical functions: $DPI = 65.58 BW^{0.714}$, $DPI = 53.64 BW^{0.714}$, $DPI = 44.7 BW^{0.714}$ and $DPI = 37.76 BW^{0.714}$, corresponding to 80, 100, 120 and 140 % DPI respectively, were $DPI = 44.7 BW^{0.714}$ for *L. vannamei* is considered 100 %, are presented in figure 4 and compared to the transformed DPI data obtained from feeding tables reviewed in this study.

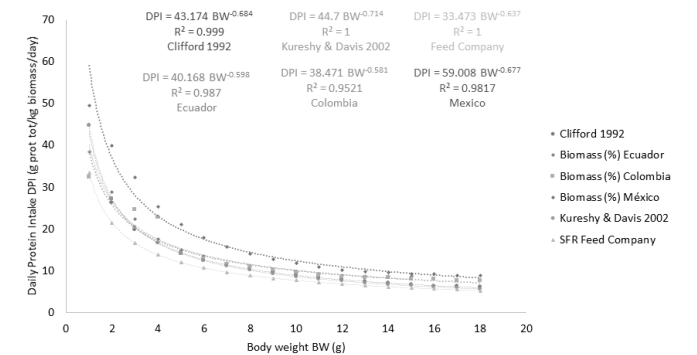


Figure 3. Daily protein intake (g prot/kg biomass/day) mathematical functions related to *L. vannamei* Body weight (g) adjusted from transformed data contained in different feeding tables based on %Biomass related to Body Weight (Clifford 1992, Davis et al., 2006 and Quintero and Roy 2010, for Ecuador, Colombia and México), compared with $DPI=44.7(BW)^{0.74}$.
Figure 3. Funciones matemáticas de la ingesta diaria de proteína (g prot/ kg biomasa/día) en función del peso corporal (g) de *L. vannamei* ajustadas a partir de datos transformados provenientes de diferentes tablas de alimentación de %Biomasa en relación con el Peso Corporal (Clifford 1992, Davis et al 2006 y Quintero and Roy 2010 para Ecuador, Colombia y México) comparadas con $DPI=44.7BW^{0.74}$.

First trial: Daily protein intake (DPI)

Significant differences were found in weight gain with different DPI functions (Table 3), with organisms fed 80 and 100 % DPI showing significantly less growth than those fed 120 and 140 %. At the end of the experiment, no significant differences were found between 120 and 140 %. We found significant differences in specific growth rate, average weekly growth, feed conversion rate, protein efficiency and nitrogen retention (Table 4). The organisms fed with 80 and 140 % DPI rates showed the lowest and highest values respectively in all cases. Three homogeneous groups were found in the

Table 3. *L. vannamei* Weight gain (g) under laboratory conditions fed with 80, 100, 120 and 140 % (crude protein) Daily Protein Intake (DPI).

Tabla 3. Ganancia en peso (g) de *L. vannamei* bajo condiciones de laboratorio alimentados con 80, 100, 120 y 140 % (proteína cruda) de ingesta diaria de proteína (IDP).

Time (Week)	Daily Protein Intake (%)			
	80	100	120	140
1	0.62±0.11a	0.62±0.01a	0.71±0.04a	0.79±0.17a
2	1.24±0.07a	1.31±0.06ab	1.53±0.07b	1.73±0.18c
3	3.03±0.10a	3.08±0.06ab	3.39±0.15b	3.79±0.21c
4	3.77±0.19a	4.02±0.08a	4.58±0.21b	5.00±0.30b
5	3.84±0.16a	4.3±0.18a	5.01±0.28b	5.60±0.37b

Table 4. Performance of *L. vannamei* under laboratory conditions fed with 80, 100, 120 and 140 % (crude protein) Daily Protein Intake (DPI).

Tabla 4. Desempeño de *L. vannamei* en condiciones de laboratorio alimentados con 80, 100, 120 y 140 % (proteína cruda) de Ingesta Diaria de Proteína (IDP).

	Daily Protein Intake (%DPI)			
	80	100	120	140
WG (%)	481.14±13.98a	526.34±6.87ab	602.55±34.10bc	636.81±61c
SGR (%)	3.14±0.06ab	3.32±0.03ab	3.59±0.11bc	3.7±0.20c
AWG (g)	0.76±0.03a	0.85±0.36a	1.00±0.5b	1.12±0.07b
S (%)	95.83±4.81a	88.8±4.81a	97.2±4.81a	94.4±4.81a
FCR	1.12±0.02a	1.26±0.03ab	1.32±0.07b	1.41±0.09b
PER	2.37±0.12a	2.09±0.1b	2.01±0.05b	1.89±0.05b
NR	40.45±0.90a	35.76±0.03b	34.38±1.92b	32.26±2.09b

WG=Weight gain, SGR=Specific growth rate, AWG=Average weekly growth, S=Survival rate, FCR=Feeding conversion ratio, PER=Protein efficiency ratio. C:N ratio of diet=7.98.

specific growth rate, showing significantly differences at 140 %. A higher feed conversion rate was found in treatments with 120 and 140 %. The protein efficiency ratio and nitrogen retention showed two homogeneous groups, where (120 %) DPI= 53.64 BW^{-0.714} was better in growth, PER and NR. No differences were found in survival rate due to DPI at any level.

Second trial: Bioassay with five CBH:CP ratios using same DPI level and Lip:CP ratio

We found a significant effect by CBH:CP ratio on weight gain, specific growth rate, feed conversion rate, protein efficiency ratio and nitrogen retention (Table 5). No significant differences were found in the survival rate. Significant differences were observed between treatments with 2.1 and 1.5 compared to the rest CBH:CP ratios. The specific growth rate also presented significant differences between treatments, with higher values in 2.1 and 1.5 CBH:CP. The feed conversion rate and protein efficiency ratio showed the highest values at the highest levels of CBH:CP (2.1 and 1.5). The weekly average growth showed an effect by Carbohydrate:Crude protein rate, with higher values in 2.1, 1.5 and 1.1 CBH:CP. Nitrogen retention was statistically higher in 2.1 and lower

in 0.6 CBH:CP respectively. Survival rate was not affected by CBH:CP ratios.

DISCUSSION

The review of the feeding tables shows great variability in %Biomass for Shrimp BW lower than 5 grams (Figure 1), mainly due to the variability in the protein content (level or percentage) in feeds recommended for small shrimps. In this sense, feeding tables not necessarily represent the real amount of protein provided to the aquaculture system, since they are not related with the protein content in feeds. When different protein levels in feeds are tested (25-45 % CP), the use of feeding tables as a protocol to feed the shrimps, with same feeding ratio based on % Biomass and BW, implicitly provide different amounts of protein according to the feed protein level (%), generating differences not necessarily due to the protein level, but the real amount of protein provided for shrimps. Kureshy and Davis (2002), using the same approach, tested different amounts of protein (g protein/kg shrimp biomass/day) as DPI for different shrimp BW and found a growth rate increase related to DPI increase, but also found an increase in Protein Efficiency (PE) from lower to medium DPI, but a decrease in PE at greater amount of DPI. Therefore, the maximum growth at high DPI have consequences in lowering PE and Nitrogen retention (NR), with side effects on nitrogen residuals in the aquaculture environment.

For this reason, in this study, we select the DPI data provided by Kureshy and Davis (2002), for different BWs with the better Protein retention (37.2 % in average) to adjust the mathematical model DPI=44.7(BW)^{-0.714} (Figure 2). Using this mathematical model, we adjust the transformed data provided by the feeding tables from different sources and found not only high correlation (>0.9501), but surprisingly a similar trend between the adjusted DPI model obtained in this study from data reported by Kureshy and Davis (2002), compared to the DPI adjusted from Clifford (1992) data, recommended by relevant shrimp feed companies like Nicovita and Purina (Figure 3). The four different variants in DPI mathematical functions (DPI=37.76(BW)^{-0.714}, DPI=44.7(BW)^{-0.714}, DPI=53.64(BW)^{-0.714}, and DPI=65.58(BW)^{-0.714}), respectively corresponding to 80, 100, 120 and 140 % DPI=44.7(BW)^{-0.714}

Table 5. Performance of *L. vannamei* cultured in laboratory with five experimental diets with different CBH:CP ratios and same Lip:CP ratio (crude protein).

Tabla 5. Desempeño de *L. vannamei* cultivado en laboratorio con cinco dietas experimentales con cinco proporciones diferentes CHO:CP y una proporción Lip:CP (proteína cruda)

CBH:P (g/g)	Lip:P (g/g)	C:N	WG (%)	SGR (%.day ⁻¹)	AWG (g)	S (%)	FCR	PER	NR
2.1	0.2	12.15	323.3±15.7a	2.3±0.10 a	1.27±0.12 a	86.5±5.8a	2.25±0.08 a	1.84±0.07 a	30.65±1.93 a
1.5	0.2	9.87	297.4±7.6ab	2.2±0.10ab	1.14±0.06ab	94.4±2.8a	2.16±0.04ab	1.60±0.03 b	25.87±0.78 b
1.1	0.2	8.51	267.0±1.5 b	2.0±0.10 b	1.14±0.19 b	89.5±6.7a	2.07±0.01ab	1.40±0.001bc	23.33±0.13bc
0.8	0.2	7.64	269.0±9.7 b	2.0±0.10 b	1.22±0.12ab	92.3±7.7a	1.95±0.08 b	1.37±0.06 c	22.28±1.67 c
0.6	0.2	7.00	285.3±5.2ab	2.1±0.03ab	1.04±0.05 b	89.3±2.3a	1.66±0.02 c	1.45±0.02bc	23.91±0.58bc

WG=Weight gain, SGR=Specific growth rate, AWG=Average weekly growth, S=Survival rate, FCR=Feeding conversion ratio, PER=Protein efficiency ratio. C:N ratio of diet=7.98

for *L. vannamei*, cover and represent the different DPI data calculated from the feeding tables reviewed in this study (Clifford, 1992; Kureshy and Davis, 2002; Davis *et al.*, 2006; Quintero and Roy, 2010). For this reason were used to select the DPI mathematical model to evaluate the different Carbohydrate:Crude Protein ratios with same DPI and shrimp BW (Figure 4).

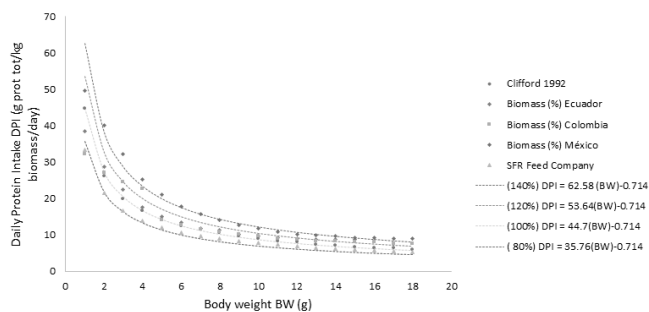


Figure 4. Daily Protein Intake (g prot/kg biomass/day) mathematical functions: $DPI=37.76(BW)^{-0.714}$, $DPI=44.7(BW)^{-0.714}$, $DPI=53.64(BW)^{-0.714}$ and $DPI=65.58(BW)^{-0.714}$, respectively corresponding to 80, 100, 120 and 140 % DPI= $44.7(BW)^{-0.714}$ for *L. vannamei*, where BW is Body weight (g), compared with DPI data calculated from different feeding tables (%Biomass related to Body Weight).

Figura 4. Funciones matemáticas de Ingesta Diaria de Proteína (g prot/kg biomasa/día): $IDP=37.76(PC)^{-0.714}$, $IDP=44.7(PC)^{-0.714}$, $IDP=53.64(PC)^{-0.714}$ e $IDP=65.58(PC)^{-0.714}$, corresponden respectivamente a 80, 100, 120 y 140 % $IDP=44.7(PC)^{-0.714}$ para *L. vannamei* Donde PC es el peso corporal (g), comparadas con datos de IDP calculados a partir de datos provenientes de diferentes tablas de alimentación (%Biomasa con relación al Peso Corporal).

We observed that variations in DPI levels using the same protein and CBH:CP ratios have a direct effect on growth, PER and NR, showing a linear increase in all growth parameters with DPI. In survival, this trend was not observed. A variation of the optimal protein requirements of *L. vannamei* from 20 to 45 % has been reported (Kureshy and Davis, 2002, Hu *et al.*, 2008; Yaemssoksawat *et al.*, 2008; Sui *et al.*, 2015, Lee and Lee, 2018), where these variations are influenced by the stocking density and aquaculture system (Brito *et al.*, 2001). Xia *et al.* (2010) reported that adequate protein values in diet under high-density conditions, in the absence of natural productivity, must be at least 43 %, results in a linear growth as protein increases with a slight decrease at higher percentages. Similarly, Jang *et al.* (2014) found a greater weight gain and specific growth rate feeding with 40 and 45 % protein, not having significant differences between them, and suggesting that values higher than 40 % are not necessary.

In the experiments with variants of the DPI mathematical model, we find an increase in growth parameters and feed conversion rates, but a decrease in protein efficiency and nitrogen retention with the increase in DPI level. Although no significant differences were found between the highest DPI (120 % and 140 %), in terms of growth parameters and nitrogen retention, these results suggest that the change in the feed protein levels must be adjusted by DPI mathematical functions to compare feeds with different formulas or

CBH:CP ratios. In this study, a decrease in protein efficiency and nitrogen retention was found with the increase in DPI at similar levels of protein content and CBH:CP ratio, suggesting that the rest of the energy substrates in the diet provided favor the adequate use of this.

Regarding DPI, the levels used agree with the daily protein level required by *L. vannamei* determined by Kureshy and Davies (2002), Clifford (1992) and Tacon (2002), as well as the recommendations by relevant shrimp feed companies such as Nicovita (Clifford, 1992) and Purina (2021). In addition, the flexibility in the mathematical model may favor their adjustment to obtain better performance of the different aquaculture systems in economic and environmental terms, also testing different genetic linages and proportionality between different ingredients and protein.

Modern aquaculture requires maximum growth with a reduction in protein intake and nitrogen residuals. The protein in the diet can be reduced if the energy required comes from another source such as carbohydrates, which can reduce the emission of residual nutrients and feed costs (Zainuddin *et al.*, 2014). The results obtained in this study shows that increasing the proportion of carbohydrates/protein in feeds, with the same DPI mathematical model that meets the requirements of the organisms, will significantly favor the performance of the system without cost in survival. Carbohydrates can provide important energy content and can be used by shrimp for the synthesis of chitin, however, their ability to use them is limited, due to their low capacity to digest and regulate plasma glucose concentrations (Guo *et al.*, 2006).

It has been observed that the best performance is at levels around 40 %. Zainuddin *et al.* (2014) determined the best growth for *L. vannamei* with 38 % carbohydrates compared to lower levels, suggesting that high carbohydrates levels can be used if it is fed with a high frequency in small amounts, which favors the use of carbohydrates and increases fat reserves with a more efficient lipogenesis process. Pascual *et al.* (2004) found better immunological performance with high carbohydrates levels, determining that these can favor the functioning of the organisms feeding appropriately. In this sense, we observed that by supplying the same DPI and Lip:CP ratio, the differential contribution of carbohydrates increasing CBH:CP ratio to 2:1 has a significant effect on growth, protein efficiency and nitrogen retention without cost in survival.

CONCLUSION

Feeding based on $DPI=53.64(BW)^{-0.714}$ corresponding to 120 % $DPI=44.7(BW)^{-0.714}$, is sufficient to achieve optimal growth of *L. vannamei* juveniles, at least within a range of 2 to 8 g in clear water systems without natural productivity. DPI mathematical model show elasticity to adapt to different shrimp feed management scenarios and can be used to evaluate feed formulations in the context of genetic linages. A significant effect on weight gain, specific growth rate, feed conversion rate, protein efficiency and nitrogen retention

were found due to DPI levels and CBH:CP ratios. Growth parameters and feed conversion rates increase in both cases, but protein efficiency and nitrogen retention diminish with DPI levels using feeds with similar protein level and CBH:CP ratio and increases with CBH:CP ratios at same DPI level using feeds with low fishmeal content, with potential benefits to decrease risks of contamination and eutrophication. Satisfying the protein needs of the organisms, it allows the use of CBH:CP ratios to maximize the use of protein in feeds and performance of the aquaculture system without complications, such as decreases growth and mortality or environmental impacts like pond or ecosystem eutrophication.

ETHICS STATEMENT

Mexican law excludes fish and crustacean taxa with regard to (a) humane care during the transport of animals (NOM-051-ZOO-1995), (b) the technical specifications for the production, care and use of animals in laboratory conditions (NOM-062-ZOO-1999) and (c) the humane sacrifice of domestic and wild animals (NOM-033-ZOO-1995). Nonetheless, we voluntarily followed special procedures for shrimp care, at the end of the experiments were sacrificed in ice water.

ACKNOWLEDGES

The authors want to thank Marcos Cadena, Sonia Rocha, Sandra de la Paz for their valuable technical assistance during the experimental feed formulation, laboratory analysis and aquaculture experiments.

REFERENCES

- Akiyama, H., Nakamura, N., Nagasaka, S., Sakamaki, S. and Onozawa, Y. 1992. Hypercalcaemia due to all-trans retinoic acid. *Lancet*, 339, 308-309. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)91382-i](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)91382-i)
- Brito, R., Rosas, C., Chimal, M.E. and Gaxiola, G. 2001. Effect of different diets on growth and digestive enzyme activity in *Litopenaeus vannamei* (Bone, 1931) early post-larvae. *Aquaculture Research*, 32: 257-266. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00548.x>
- Clifford, H.C. 1992. Marine shrimp pond management: Review. Pages 110-137 in J. Wyban, editors. Proceeding of the special session on shrimp farming. The World Aquaculture Society. Baton Rouge, LA, USA.
- FAO. 2020. The state of world fisheries and aquaculture: Sustainability in action. FAO, Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.
- Gil-Núñez, J. C., Martínez-Córdova, L.R., Servín-Villegas, R., Magallon-Barajas, F.J., Bórquez-López, R.A., González-Galaviz, J.R., and Casillas-Hernández, R. 2020. Production of *Penaeus vannamei* in low salinity using diets formulated with different protein sources and percentages. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 48, 396-405. <https://doi.org/10.3856/vol48-issue3-fulltext-2361>.
- González-Félix, M.L., Lawrence, A.L., Gatlin, D.M. and Pérez-Velázquez, M. 2002. Growth, survival, and fatty acid composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* fed different oils in the presence and absence of phospholipids. *Aquaculture*, 205, 325-343. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00684-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00684-6).
- Guo, R., Liu, Y.J., Tian, L.X. and Huag, J.W. 2006. Effect of dietary cornstarch levels on growth performance, digestibility, and microscopic structure of white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in brackish water. *Aquaculture Nutrition* 12, 83-88. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2006.00384.x>
- Güroy, D., Sahin, I., Güroy, B., Altin, A. and Merrifield, D.L. 2012. Effect of dietary protein level on growth performance and nitrogen excretion of the yellow tail cichlid, *Pseudotropheus acei*. *Israeli Journal of Aquaculture*, 64:1. DOI:10.46989/001c.20656
- Hu, Y., B. Tan, K. Mai, Q. Ai, S. Zheng, and K. Cheng. 2008. Growth and body composition of juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed different ratios of dietary protein to energy. *Aquaculture Nutrition*, 14: 499-506. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00555.x>
- Jannalhulla, R., Chitra, V., Vasanthakumar, D., Nagavel, A., Ambasankar, K., Muralidhar, M. and Syama-Dayal, J. 2019. Effect of dietary lipid/essential fatty acid level on Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) reared at three different water salinities—Emphasis on growth, hemolymph indices and body composition. *Aquaculture*, 734405. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734405>.
- Jang, I.K., Shahkar, E., Kim, S.K., Yun, H., 2014. Evaluation of optimum dietary protein levels for juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Crustacean Biology*, 34, 552-558. <https://doi.org/10.1163/1937240X-00002267>
- Kureshy, N. and Davis, D. A. 2002. Protein requirements for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 204, 125-143. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00649-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00649-4).
- Lee, C., and J. K. Lee. 2018. Dietary protein requirement of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in three different growth stages. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 21, 30. <https://doi.org/10.1186/s41240-018-0105-0>.
- Limsuwan, C. and Junratchakoo, P. 2004. Shrimp Culture Industry of Thailand. Magic Publishing, Bangkok.
- Liu, D. H., He, J.G., Liu, Y.J., Zheng, S.X. and Tian, L.X. 2005. Effects of dietary protein levels on growth performance and immune condition of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* juveniles at very low salinity. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 44: 217-223.
- Pascual, C., Zenteno, E., Guzon, G., Sanchez, A., Gaxiola, A., Tabeada, G., Suarez, J., Rosas, T., 2004. *Litopenaeus vannamei* juveniles have an energetic balance and immunological response to dietary protein. *Aquaculture*, 236, 431-450. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.015>.
- Quintero, H. E., Roy, L. A. 2010. Practical feed management in semi-intensive systems for shrimp culture: The shrimp book 2010 pp.443-453 ref.15. Alday-Sanz, V. (Editores), ISBN: 9781904761594, Record Number: 20113353954, Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Shiau, S.Y. 1997. Utilization of carbohydrates in warm water fish with reference to tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 151, 79-96. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01491-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01491-3).
- Smith, L.L., Lee, P.G., Lawrence, A.L. and Strawn, K. 1985. Growth and digestibility by three sizes of *Penaeus vannamei* Boone: effects of dietary protein level and protein source. *Aquaculture* 46, 85-96. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90193-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90193-0).

- Sui, L., Ma, G. and Deng, Y. 2015. Effect of dietary protein level and salinity on growth, survival, enzymatic activities and amino-acid composition of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) juveniles. *Crustaceana*. 88: 82-95. <https://doi.org/10.1163/15685403-00003390>
- Tacon, A.G.J. and Akiyama, D. 1997. Feed Ingredients. In: Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture, Volume 6. World Aquaculture Society, Baton Rouge, US.
- Wang, X.D., E.C. Li, S.F. Wang, J.G. Qin, X.F. Chen, Q.M. Lai, K. Chen, C. Xu, L. Gan, N. Yu, Z.Y. Du and L.Q. Chen. 2015. Protein-sparing effect of carbohydrate in the diet of white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Aquaculture Nutrition*. 21: 904-912.
- Wasiolesky, W., Atwood, H., Browdy, C. 2006. Effect of natural production in a zero-exchange suspended microbial floc-based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258, 396-403. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030>.
- Xia, S., Li, Y., Wang, W., Rajkumar, M., Paramasivam, K., Vasagam, K. and Wang, H. 2010. Influence of dietary protein levels on growth, digestibility, digestive enzyme activity, and stress tolerance in white-leg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), reared in high-density tank trials. *Aquaculture Research*, 41, 1845-1854. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02585.x>.
- Xu, C., Li, E.C., Liu, Y. and Shifeng, W. 2017. Effect of dietary lipid level on growth, lipid metabolism and health status of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at two salinities. *Aquaculture Nutrition*. 24 (1). DOI:10.1111/anu.12548
- Yaemsooksawat N., O. Jintasataporn, N. Areechon, S. Puntuma and Ch. Thongtuak. 2009. Effect of dietary protein level on growth and immunity of *Litopenaeus vannamei*, Boone 1931. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 31(1): 15-20.
- Zainuddin, H., Haryati H. and Aslamyah, S. 2014. Effect of dietary carbohydrate levels and feeding frequencies on growth and carbohydrate digestibility of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under laboratory conditions. *Journal of Aquaculture Research Development*. 5, 274. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000274>
- Zhang, S., Li, J., Wu, X., Zhong, W., Xian, J., Liao, S. and Wang, A. 2013. Effects of different dietary lipid levels on the growth, survival, and immune-related gene expression in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*. 34, 1131-1138. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.016>



Emergencia y características agronómicas del *Cucumis sativus* a la aplicación de quitosano, *Glomus cubense* y ácidos húmicos

Emergency and agronomic characteristics of *Cucumis sativus* after the application of chitosan, *Glomus cubense* and humic acids

Juan José Reyes-Pérez¹, Marisol Rivero-Herrada¹, Cristian Josué Andagoya Fajardo¹, Félix Alfredo Beltrán-Morales², Luís Guillermo Hernández-Montiel³, Ana Elizabeth García Liscano⁴ y Francisco Higinio Ruiz-Espinoza^{2*}

¹ Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Av. Quito. Km 1 ½ vía a Santo Domingo. Quevedo, Los Ríos, Ecuador.

² Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, Baja California Sur, México.

³ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, Baja California Sur 23090, México.

⁴ Instituto Tecnológico Superior Ciudad de Valencia, Quevedo, Ecuador.

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue evaluar el comportamiento de la emergencia y características agronómicas del cultivo de pepino (*Cucumis sativus* L.) ante la aplicación de quitosano, hongos micorrízicos y ácidos húmicos en condiciones protegidas. La investigación se realizó en un invernadero y laboratorio de Biología Molecular y Microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. El material vegetativo fueron las variedades comerciales de pepino (Inivit y Racer), con tratamientos de quitosano (3 g L⁻¹), *Glomus cubense* (20 esporas/100 g de suelo) y ácidos húmicos (1:30 v/v). Se evaluó emergencia, variables morfométricas, indicadores de crecimiento e indicadores de producción. Los resultados indicaron que la variedad Racer registró el mayor porcentaje de emergencia, el hongo *Glomus cubense* presentó la mayor emergencia (71.7%). Mientras el *Glomus cubense* en la variedad Inivit mostró la mayor biomasa fresca (22.6 g). En tanto que el quitosano (285.8 g) y el *Glomus cubense* (277.9 g) influyeron en el peso del fruto. A su vez el quitosano en la variedad Inivit generó el mayor rendimiento (5,703 kg ha⁻¹). En general se comprobó que la aplicación del hongo *Glomus cubense* induce a incrementos en la emergencia, biomasa fresca, biomasa seca del cultivo de pepino, por su parte la aplicación de quitosano en ambas variedades generó mayor rendimiento.

Palabras claves: Bioestimulantes, biofertilización, producción, germinación, biomasa.

ABSTRACT

The objective of the research was to evaluate the emergence behavior and agronomic characteristics of the cucumber (*Cucumis sativus* L.) crop with the application of chitosan, mycorrhizal fungi and humic acids under protected conditions. The research was carried out in a greenhouse and a laboratory of Molecular Biology and Microbiology of the State Technical University of Quevedo, Ecuador. The vegetative material was the commercial varieties of cucumber (Inivit and Racer), with chitosan (3 g L⁻¹), *Glomus cubense* fungi (20

spores/100 g of soil) and humic acids (1:30 v/v) treatments. Emergence, morphometric variables, growth indicators and production indicators were evaluated. The results indicated that the Racer variety registered the highest percentage of emergence, and the *Glomus cubense* fungi presented the highest emergence (71.7%). On the other hand, the *Glomus cubense* fungi showed the highest fresh biomass (22.6 g) in the Inivit variety. Chitosan (285.8 g) and the *Glomus cubense* fungi (277.9 g) influenced fruit weight. Chitosan in the Inivit variety (5703.7 g) generated the highest yield. In general, it was found that the application of the *Glomus cubense* fungi induces an increase in emergence, fresh biomass, dry biomass of the cucumber crop, while the application of chitosan in both varieties generated higher yields.

Keywords: Biostimulants, biofertilization, production, germination, biomass.

INTRODUCCIÓN

El pepino (*Cucumis sativus* L.), es una planta cultivada en casi todo el mundo y cuyo fruto tiene bastante aceptación entre la población, originario de la India y domesticado en Asia (López *et al.*, 2011; Reyes *et al.*, 2017). Las variedades más comunes del pepino son el americano, el europeo, el holandés y el pepino oriental (Leiva, 2018). Por lo que es uno de los cultivos con más demanda mundial, al ser muy utilizado en la dieta del ser humano, ya que al consumir un pepino equivale a beberse un vaso de agua, debido a el 96 % de su peso es agua y el 4 % restante es materia sólida con un gran valor nutritivo, pues es una gran fuente de minerales y vitaminas (Flores, 2017).

En el Ecuador el pepino es una hortaliza cultivada principalmente por pequeños grupos de productores en áreas reducidas de terreno agrícola, que, aun así, asumen la responsabilidad de mantener disponibles esta hortaliza en los mercados nacionales, sin embargo, el problema, es no poseer alternativas agroecológicas que se introduzcan en el proceso de producción y que sean accesible para los mismos. Según el Sistema de Información Pública Agropecuaria (2018), actualmente el área de siembra en Ecuador, se ha

*Autores para correspondencia: Francisco Higinio Ruiz-Espinoza
 Correo electrónico: fruiz@uabcs.mx

Recibido: 26 de enero de 2021

Aceptado: 26 de marzo de 2021

incrementado desde el año 2010, de tal manera que existen aproximadamente 1,842 ha cosechadas.

A nivel mundial y en el Ecuador la agricultura, que entre sus procesos productivos requiere del uso de insumos diferentes a los comúnmente utilizados como los fertilizantes químicos, por lo que el aumento de productos que tiendan a reducir el impacto ambiental y que cada vez se vuelvan más rentables, esto debido a la eficiencia y accesibilidad a otras alternativas, entre las que figuran el uso de bioestimulantes como el quitosano, hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y ácidos húmicos (Torres *et al.*, 2018; Baker *et al.*, 2020).

Durante la última década los estudios enfocados a la aplicabilidad del quitosano en otras áreas como la agricultura se han incrementado debido principalmente al mejoramiento del crecimiento y productividad y calidad de frutos de diferentes cultivos (Domini, 2018, Basit *et al.*, 2020).

Por otra parte, el uso de los ácidos húmicos en plantas, están relacionados con la potencialización de la fisiología de las plantas, promover el crecimiento y mejorar la respuesta al estrés (Veobides *et al.*, 2018), formación de raíces adventicias (Baldotto *et al.*, 2012), elongación de la raíz y la formación de pelos de la raíz (Canellas *et al.* 2015). Todos estos factores incrementan el área de la masa de raíces (volumen de raíces) y la superficie de las raíces, lo que contribuye a una mayor absorción de agua y nutrientes (Eyheraguibel *et al.*, 2008).

El uso de las micorrizas arbusculares mejoran el crecimiento vegetal (Medina, 2016), en el mismo sentido Arias *et al.* (2019) mencionan que la colonización micorrízica produce cambios físicos, bioquímicos y fisiológicos en las raíces que conducen a un mejor estado general de la planta y contribuyen a aliviar las situaciones de estrés de carácter abiótico (metales pesados, salinidad) y bióticos (ataques de patógenos, cambios microbianos en la rizosfera) (Moreno *et al.*, 2018). Por estos motivos mencionados anteriormente y la necesidad de buscar opciones diferentes, y con beneficio a la salud humana, ambiental, social, y nuevas tecnologías de producción agrícola, se desarrolló una investigación donde el objetivo fue evaluar el comportamiento de la emergencia y características agronómicas del cultivo de pepino (*Cucumis sativus* L.) ante la aplicación de quitosano, hongos micorrízicos (*Glomus cubense*) y ácidos húmicos en condiciones protegidas

MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de la investigación se llevó a cabo en el invernadero del Campus Experimental "La María" ubicado en el km 7.5 de la vía Quevedo-Mocache en la zona del cantón Mocache, provincia de Los Ríos, ubicada en el kilómetro 7.1/2 de la vía Quevedo – El Empalme. La ubicación geográfica es 1°04'48.6" latitud Sur y 79°30'04.2" longitud Oeste, a una altitud de 75 m sobre el nivel del mar. El predio se encuentra en una zona climática tropical húmeda, con temperatura media anual de 24,8 °C, precipitación media anual de 2252 mm; 84 % de humedad relativa y 894.0 h de sol al año. Los cultivares estudiados fueron: Inivit y Racer. Las semillas se desinfectaron con Ca(ClO)₂ al 5 %, imbibándose por 5 min, lavado (agua destilada), dejándose en reposo por 4 horas sin agua.

Diseño experimental

Se evaluaron 6 tratamientos (Tabla 1), donde se incluyó un testigo de cada variedad con agua destilada, el diseño experimental utilizado fue un completamente al azar con arreglo factorial 2 x 4 en 3 repeticiones, siendo el primer factor las variedades y el segundo factor los bioestimulantes, con su respectivo control.

Tabla 1. Tratamientos del uso de Quitosano, *Glomus cubense* y ácidos húmicos en pepino.

Table 1. Treatments for the use of Chitosan, *Glomus cubense* and humic acids in cucumber.

Factor A Variedades pepino	Factor B (Bioestimulantes)	Tratamientos
V1: Inivit	T1: Quitosano (3 g L ⁻¹ de agua)	V1T1: Inivit + Quitosano
		V1T2: Inivit + <i>Glomus cubense</i>
		V1T3: Inivit + Ácidos húmicos
		V1T4: Inivit + Agua
V2: Racer	T2: <i>Glomus cubense</i> (20 esporas/100 g de suelo)	V2T1: Racer + Quitosano
		V2T2: Racer + <i>Glomus cubense</i>
		V2T3: Racer + Ácidos húmicos
		V2T4: Racer + Agua
	T3: Ácidos húmicos (1:30 v/v)	
	T4: Control	

Desarrollo del experimento

El trabajo se llevó a cabo en invernadero casa sombra con una superficie de 20 m de largo x 6m de ancho con una superficie total de 120 m², primeramente se preparó el sustrato para el semillero, con una mezcla de 4:2:1, cuatro partes de tierra, dos partes de materia orgánica obtenida de vermicomposta y una parte de cascarilla de arroz, posteriormente, se realizaron los tratamientos de las semillas, estas imbibieron de los bioestimulantes por un lapso de 10 minutos, para luego dejarse secar por un período de 4 horas antes de la siembra. La siembra se realizó de forma directa en bolsas de plástico de 60 x 60 cm, con una densidad de 10 macetas por m².

Aplicación de los tratamientos

La aplicación del quitosano 3 g L⁻¹ se realizó de acuerdo a lo propuesto por González *et al.* (2015), mientras que los hongos micorrízicos arbusculares se empleó la especie *Glomus cubense* en dosis de 20 esporas/100 g suelo según la metodología de Rivera *et al.* (2003), mientras que los ácidos húmicos fueron 1:30 v/v de acuerdo a Chen *et al.* (2004), la primera aplicación se realizó a los 7 días después de la siembra, posteriormente se realizaron 3 aplicaciones más después de la primera en intervalos de 7 días.

Manejo del cultivo

El tutorado se realizó a los 20 después de la siembra, se realizó una poda a los 30 días después de la siembra, eliminando los brotes axilares, dejando los ejes productivos,

seguidamente se aplicó oxiclóruo de cobre $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ (3 g L^{-1} de agua) en aspersión foliar. Cuando se presentaron insectos plaga se efectuaron dos aplicaciones (7 y 15 después de la siembra), de Actara (IA: Thiamethoxam) en dosis de 0.3 kg ha^{-1} , mientras que para el control de enfermedades se aplicó Daconil (IA: Clorotalonil) en dosis de 1.50 L ha^{-1} . Por su parte la cosecha se realizó a los 60 días después de la siembra al alcanzar la madurez comercial.

VARIABLES ESTUDIADAS

Las variables evaluadas fueron: Porcentaje de emergencia (E) de acuerdo a Maguire (1962), la biomasa fresca y seca considero la planta completa (tallos, hojas y raíces), esta se determinó al pesar cada plántula, en una balanza analítica expresándose en gramos de materia vegetal fresca por su parte la biomasa seca se determinó al colocar la biomasa fresca en una estufa de secado, a temperatura de 80 °C durante 72 h. En cuanto a los indicadores de crecimiento evaluados fueron: Altura de planta (cm), se consideraron 10 plantas por cada unidad experimental a los 35 después de siembra, diámetro de tallo (mm) igualmente a los a los 35 después de siembra mediante un calibrador de vernier, el número de hojas a los 45 después de siembra, en cuanto al número de flores por planta se realizó cuando la floración fue al 50 %, esto ocurrió entre los 40 y 45 después de siembra. En lo referente a los indicadores de producción, fueron el número de frutos por planta, se contaron por planta de cada tratamiento. Previamente para el desarrollo de la investigación se estableció el registrar esta variable solo con datos obtenidos de la primera cosecha, en cuanto a masa fresca del fruto (g), se procedió al registro de la masa en balanza analítica, por último, el rendimiento (kg ha^{-1}), se obtuvo al pesar los frutos cosechados por cada tratamiento, para posteriormente extrapolar a kg ha^{-1} .

PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO

Los datos se procesaron a través del Paquete Estadístico Statistica v. 10.0 empleando un análisis de varianza de clasificación simple. En el caso de los datos en porcentaje fueron transformados mediante la fórmula $\text{Arc Sen } \sqrt{x}$. En los casos en que las variables mostraron diferencias estadísticas significativas, se utilizó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Emergencia

En la emergencia, el quitosano (T1) fue similar a los ácidos húmicos (T3), mientras que el *Glomus cubense* (Tabla 2), jugó un papel importante en la emergencia, la variedad Racer (V2) logró el mayor porcentaje de emergencia superando a la variedad Inivit (V1) en 8.9 % ($p \leq 0,05$). En lo referente a los bioestimulantes el porcentaje de mayor emergencia, se mostró con la aplicación del *Glomus cubense* (T2) (Tabla 2), pero en igualdad estadística con el control (T4) y los ácidos húmicos (T3), sin embargo mientras que las interacciones entre variedades y bioestimulantes, todos los tratamientos

Tabla 2. Porcentaje de emergencia en variedades de pepino a la aplicación de Quitosano, *Glomus cubense* y ácidos húmicos en condiciones protegidas. **Table 2.** Germination emergence in cucumber varieties after the application of Chitosan, *Glomus cubense* and humic acids under protected conditions.

Tratamientos	PE	
Variedades		
V1: Inivit	57.5	b
V2: Racer	66.4	a
Tratamientos		
T1: Quitosano	48.4	b
T2: <i>Glomus cubense</i>	71.7	a
T3: Ácidos húmicos	60.5	a b
T4: Agua	67.2	a
Interacciones		
V1T1: Inivit + Quitosano	30.0	b
V1T2: Inivit + <i>Glomus cubense</i>	73.3	a
V1T3: Inivit + Ácidos húmicos	52.2	a b
V1T4: Inivit + Agua	74.4	a
V2T1: Racer + Quitosano	66.7	a
V2T2: Racer + <i>Glomus cubense</i>	70.0	a
V2T3: Racer + Ácidos húmicos	68.9	a
V2T4: Racer + Agua	60.0	a
Promedio	61.9	
Coefficiente de variación (%)	13.6	

PE: Porcentaje de emergencia. T1: 3 g L^{-1} de agua; T2: 20 esporas/100 g de suelo; T3: 3 g L^{-1} de agua; T4: Agua destilada. * Promedios con la misma letra en cada grupo de datos no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey $P \leq 0.05$.

fueron estadísticamente iguales presentando valores que fluctúan entre 73.3 y 52.2 %, a excepción del tratamiento de la variedad Inivit con la aplicación de Quitosano (V1T1) que presentó el menor porcentaje de emergencia.

Los resultados encontrados entre variedades podrían explicarse debido a que posiblemente se tenga diferencias de reserva energética para la germinación embrionaria y no directamente por la viabilidad de los embriones, debido a la heterogeneidad en la madurez de la semilla (Doria, 2010). En este mismo sentido Ellis y Roberts (1980) indican que, efectivamente la viabilidad también depende de las variaciones genéticas dentro de una misma especie y de las condiciones previas al almacenamiento. Lo cual concuerda plenamente con los resultados encontrados en el presente estudio, dado que mientras la variedad Inivit presentó menor emergencia que la variedad Racer, estos resultados concuerdan con lo reportado por Ramírez *et al.* (2018), donde mencionan que con HMA se ve influida la germinación y emergencia de plántulas de árboles en vivero. Por su parte Vital *et al.* (2018) en semillas de girasol con HMA, señalan que la germinación de estas semillas se ve influenciada por el genotipo y el tiempo de almacenamiento. En este sentido Flores *et al.* (2020), afirman que la expresión de diferentes respuestas de las semillas a la

colonización de HMA es determinada por el carácter genotípico del huésped y del hospedero.

Biomasa fresca y biomasa seca

En los promedios de biomasa fresca de planta, el análisis de varianza ($p \leq 0.05$) determinó, que tanto, variedades, tratamientos e interacciones entre bioestimulantes y variedades presentaron significancia (Tabla 3). El mayor peso fresco de planta se obtuvo en la variedad Inivit (V1) superando a la variedad Racer (V2), mientras en la aplicación de los bioestimulantes, el *Glomus cubense* (T2) presentó el mayor valor, pero estadísticamente similar a los ácidos húmicos (T3) y al control, donde la aplicación con Quitosano (T1) registró el menor valor (Tabla 3).

En cuanto a la interacción entre variedades y bioestimulantes en la variable biomasa fresca el *Glomus cubense* en la variedad Inivit (V1T2) registró la mayor biomasa fresca por planta, sin embargo este tratamiento fue similar estadísticamente a los V1T3 y V1T4 (control), donde la aplicación del bioestimulante quitosano en la variedad Racer (V2T1) registró el menor valor.

La variable biomasa seca de planta, presentó diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos e interacciones tratamientos con variedades, entre variedades no se

Tabla 3. Biomasa fresca y seca en variedades de pepino a la aplicación de Quitosano, *Glomus cubense* y ácidos húmicos en condiciones protegidas.
Table 3. Fresh and dry biomass in cucumber varieties after the application of Chitosan, *Glomus cubense* and humic acids under protected conditions.

Tratamientos	BF (g)	BS (g)
Variedades		
V1: Inivit	17.7 a	7.00 a
V2: Racer	14.2 b	6.70 a
Tratamientos		
T1: Quitosano	13.43 b	6.30 a b
T2: <i>Glomus cubense</i>	18.17 a	8.40 a
T3: Ácidos húmicos	15.57 a b	5.30 b
T4: Agua	16.53 a b	7.60 a b
Interacciones		
V1T1: Inivit + Quitosano	13.5 b	5.80 a b
V1T2: Inivit + <i>Glomus cubense</i>	22.6 a	9.33 a
V1T3: Inivit + Ácidos húmicos	16.1 a b	5.50 a b
V1T4: Inivit + Agua	18.4 a b	7.50 a b
V2T1: Racer + Quitosano	13.4 b	6.70 a b
V2T2: Racer + <i>Glomus cubense</i>	13.7 b	7.43 a b
V2T3: Racer + Ácidos húmicos	15.0 b	5.13 b
V2T4: Racer + Agua	14.6 b	7.70 a b
Promedio	15.9	6.80
Coefficiente de variación (%)	15.04	20.26

BF: Biomasa fresca, BS: Biomasa seca. T1: 3 g L⁻¹ de agua; T2: 20 esporas/100 g de suelo; T3: 3 g L⁻¹ de agua; T4: Agua destilada. *Promedios con la misma letra en cada grupo de datos no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey $P \leq 0.05$.

presentó diferencias, sin embargo numericamente la variedad Inivit (V1) mostró mayor biomasa seca que la variedad Racer (V2), posiblemente debido el genotipo y el tiempo de almacenamiento. En lo que concierne a los bioestimulantes el T2 (*Glomus cubense*) presentó mayor biomasa seca, pero sin diferencias estadísticas con T1 y T4, siendo la aplicación con ácidos húmicos (T3) la que registró el valor menor. Por su parte las interacciones entre variedades y bioestimulantes, el V1T2 a base de *Glomus cubense* en la variedad Inivit registró la mayor biomasa seca de planta, mientras las demás interacciones que presentaron valores que oscilan entre 7,7 g a 5,5 g fueron similares estadísticamente, mientras que el tratamiento V2T3 (ácidos húmicos en la variedad Racer) mostró el menor promedio de biomasa seca (Tabla 3).

El efecto de los bioestimulantes quitosano, el *Glomus cubense* y ácidos húmicos, como promotores de crecimiento vegetal en pepino fueron estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) en la mayoría de las variables de crecimiento evaluadas; con respecto a la variable altura, los promedios en el análisis de varianza arrojó (Tabla 4), que en las variedades, tratamientos e interacciones variedades con bioestimulantes no presentaron significancia ($p \leq 0.05$).

Tabla 4. Altura, diámetro del tallo, biomasa fresca, número de hojas y número de flores en variedades de pepino a la aplicación de Quitosano, *Glomus cubense* y ácidos húmicos en condiciones protegidas.

Table 4. Height, stem diameter, fresh biomass, number of leaves and number of flowers in cucumber varieties after the application of Chitosan, *Glomus cubense* and humic acids under protected conditions.

Tratamientos	A (cm)	DT (mm)	NH	NF
Variedades				
V1: Inivit	25.3 a	4.5 a	9.3 a	7.0 a
V2: Racer	24.3 a	4.1 b	7.5 b	6.5 a
Tratamientos				
T1: Quitosano	25.2 a	4.4 a	8.8 a	6.7 a
T2: <i>Glomus cubense</i>	24.8 a	4.6 a	7.7 b	6.5 a
T3: Ácidos húmicos	25.1 a	4.5 a	8.3 a b	7.0 a
T4: Agua	24.2 a	3.7 b	8.7 a	7.0 a
Interacciones				
V1T1: Inivit + Quitosano	27.4 a	4.8 a	10.1 a	7.4 a
V1T2: Inivit + <i>Glomus cubense</i>	24.2 a	4.7 a	7.7 bc	7.1 a
V1T3: Inivit + Ácidos húmicos	25.0 a	4.7 a b	9.2 a	6.7 a
V1T4: Inivit + Agua	24.5 a	3.7 bc	10.2 a	7.0 a
V2T1: Racer + Quitosano	22.9 a	4.1 abc	7.5 b	6.0 a
V2T2: Racer + <i>Glomus cubense</i>	25.4 a	4.4 abc	7.7 b	5.9 a
V2T3: Racer + Ácidos húmicos	25.1 a	4.2 abc	7.4 b	7.3 a
V2T4: Racer + Agua	23.8 a	3.7 c	7.3 b	7.0 a
Promedio	24.8	4.3	8.4	6.8
Coefficiente de variación (%)	11.18	7.8	5.3	13.1

A: Altura de planta, DT: Diámetro del tallo, NH: Número de hojas por planta, NF: Número de flores por planta (cm). T1: 3 g L⁻¹ de agua; T2: 20 esporas/100 g de suelo; T3: 3 g L⁻¹ de agua; T4: Agua destilada. *Promedios con la misma letra en cada grupo de datos no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey $p \leq 0.05$.

Diámetro del tallo y Número de hojas

La variable diámetro de tallo en la variedad Inivit (V1) mostró ser diferente a la variedad Racer (V2). En cuanto a las aplicaciones de los bioestimulantes con Quitosano (T1), el *Glomus cubense* (T2) y ácidos húmicos (T3) fueron estadísticamente iguales ($p \leq 0.05$), pero superior al tratamiento control (T4). En lo que concierne a las interacciones variedad-bioestimulantes, los tratamientos V1T1 (variedad Inivit con la aplicación de Quitosano) y el tratamiento V1T2 (Inivit con *Glomus cubense*) registraron los mayores promedios de diámetro de tallo, siendo superiores a las demás interacciones, la menor respuesta al diámetro se presentó en la variedad Racer con el tratamiento control (V2T4).

La variable número de hojas (Tabla 4) presentó diferencias ($p \leq 0.05$) entre variedades, tratamientos e interacciones bioestimulantes-variedad. La variedad Inivit (T1) mostró el mayor número de hojas por planta, superando a la variedad Racer (V2). Por su parte el Quitosano (T1) y control (T4) fueron los que registraron los mayores promedios por planta, donde la aplicación del *Glomus cubense* quien registró el menor promedio con 7.7 hojas. Las interacciones de la variedad Inivit con la aplicación de Quitosano (V1T1), ácidos húmicos (V1T3) y tratamiento control (V1T4) registraron los mayores promedios.

El uso de bioestimulantes en los procesos de producción agrícola va en aumento, dado a sus beneficios que aportan mediante hormonas vegetales como giberelinas, auxinas, citocininas, compuestos, y/o microorganismos, cuyo uso funcional va desde mejorar el metabolismo en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Brown y Saa, 2015). Según Moreno (2018) cuando se aplican los HMA a las plantas o la rizosfera, implica la mejoría del desarrollo del cultivo, vigor, rendimiento y/o la calidad mediante la estimulación de procesos naturales que benefician el crecimiento y las respuestas a estrés biótico y/o abiótico.

Las respuesta positiva del *Glomus cubense* se hicieron presentes en el peso de la biomasa fresca de la planta, en donde el *Glomus cubense* en la variedad Inivit registró el mayor peso fresco de planta, esto según Medina (2016), se da porque la colonización micorrízica produce cambios físicos, bioquímicos y fisiológicos en las raíces que conducen a un mejor estado general de la planta, y por ende da como resultado una mayor biomasa en las plantas con las que forman simbiosis. En este mismo sentido Barrer (2009) y Calderón (2013), establecen que el uso de HMA en la agricultura contribuye a mejorar el nivel nutricional de la planta lo que se ve reflejado en mayor masa seca, crecimiento y área foliar de la planta.

Por su parte Monirul *et al.* (2018), reportan que con la aplicación de quitosano en tomate incrementa el crecimiento del cultivo, además mayores números de flores, resultados similares a lo encontrado en nuestro trabajo. De la misma manera Shehata *et al.* (2012), reportaron que la aplicación de quitosano foliar incrementó el crecimiento vegetativo y el rendimiento de pepino. Así mismo Monirul *et al.* (2018) reportan que la aplicación de quitosano en chile incrementó

las características morfológicas como altura, diámetro del tallo entre otras. Esto es similar a los resultados obtenidos de nuestra investigación demuestran que el quitosano posee beneficios en el cultivo del pepino en las características morfológicas y rendimiento, tal como lo menciona Pichyangkura y Chadchawan (2015), donde mencionan que este se utiliza como bioestimulante, tanto para estimular el crecimiento de las plantas, como para inducir tolerancia al estrés abiótico o resistencia a patógenos. En este mismo sentido Muscolo *et al.* (2013) y Canellas *et al.* (2015), mencionan que los ácidos húmicos exhiben efectos estimulantes en el crecimiento, el metabolismo y desarrollo de células vegetales en cualquier tipo de planta, generalmente debido a la absorción de las células vegetales superiores por su intervención en la aceleración de nutrientes.

En este sentido Araujo *et al.* (2012), reportaron en tabaco resultados similares a los nuestros, donde no se encontraron diferencias entre quitosano y el control en el número de hojas. Sin embargo, los resultados de nuestro trabajo son similares a los presentados por Mujica y Fuentes (2012), donde mencionan que la influencia de la inoculación de los HMA en los indicadores del desarrollo vegetativo del cultivo del tomate (altura, biomasa seca aérea) se incrementaron. En ambos casos se pudo comprobar que los tratamientos inoculados superaron al testigo, ya sea en forma líquida o sólida, sin embargo difiere en el número de flores de nuestra investigación, donde Mujica y Fuentes (2012) encontraron que la aplicación de los hongos micorrízicos indujeron la estimulación del número de flores, mientras que nuestra investigación no presentó diferencias.

Los resultados de la variable número de frutos por planta presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en las variedades, donde la variedad Inivit (V1) superó a la variedad Racer (V2). Mientras que la aplicación de los bioestimulantes no presentó significancia, sin embargo, quitosano (T1) fue superior numéricamente con 1,7 frutos por planta (Tabla 5).

En lo que respecta a las interacciones variedades y bioestimulantes el tratamiento V1T1 (variedad Inivit con quitosano) presentó los mayores promedios de número de frutos por planta, sin embargo sin diferencias entre los demás los bioestimulantes.

En este sentido la variable peso del fruto en las variedades presentó diferencias ($p \leq 0.05$), siendo la variedad Inivit (V1) la de mayor peso de frutos, mientras que los bioestimulantes aplicados, el quitosano (T1) produjo frutos de mayor peso (Tabla 5), pero en igualdad estadística con el *Glomus cubense* (T2) y ácidos húmicos (T3), mientras que en las interacciones variedad y bioestimulantes la aplicación de quitosano en la variedad Inivit (V1T1) produjo frutos de mayor peso, pero sin diferencias entre los tratamientos V1T2 y V1T3, el tratamiento control en la variedad Inivit (V1T4) y Racer (V2T4) presentaron los menores valores.

Rendimiento y peso de frutos

El rendimiento fue mayor para la variedad Inivit (V1), superando en 826.1 kg ha⁻¹ a la variedad Racer (V2). En lo que

Tabla 5. Número de frutos, rendimiento y peso del fruto en variedades de pepino a la aplicación de Quitosano, *Glomus cubense* y ácidos húmicos en condiciones protegidas.

Table 5. Number of fruits, yield and weight of the fruit in cucumber varieties after the application of Chitosan, *Glomus cubense* and humic acids under protected conditions.

Tratamientos	NFP	PF (g)	R (kg ha ⁻¹)
Variedades			
V1: Inivit	1.7 b	287.6 a	4751.0 a
V2: Racer	1.4 a	257.3 b	3924.9 b
Tratamientos			
T1: Quitosano	1.7 a	285.8 a	4807.3 a
T2: <i>Glomus cubense</i>	1.6 a	277.9 a	4656.0 a
T3: Ácidos húmicos	1.6 a	275.7 a b	4402.9 a
T4: Agua	1.4 a	250.3 b	3485.6 b
Interacciones			
V1T1: Inivit + Quitosano	1.8 a	306.5 a	5703.7 a
V1T2: Inivit + <i>Glomus cubense</i>	1.7 a b	300.6 a b	4949.7 a b
V1T3: Inivit + Ácidos húmicos	1.7 a b	294.7 a b c	4769.3 a b c
V1T4: Inivit + Agua	1.4 a	248.5 d	3581.2 b c
V2T1: Racer + Quitosano	1.7 a	265.0 a b c d	4362.2 a b c
V2T2: Racer + <i>Glomus cubense</i>	1.7 a	256.7 b c d	4036.4 b c
V2T3: Racer + Ácidos húmicos	1.7 a	255.3 c d	3911.0 b c
V2T4: Racer + Agua	1.3 a	252.1 c d	3389.9 c
Promedio	1.6	272.4	4337.9
Coefficiente de variación (%)	11.5	5.9	9.2

NFP: Número de frutos por planta, PF: Peso del fruto, R: Rendimiento; T1: 3 g L⁻¹ de agua; T2: 20 esporas/100 g de suelo; T3: 3 g L⁻¹ de agua; T4: Agua destilada. *Promedios con la misma letra en cada grupo de datos no difieren estadísticamente según la prueba de Tukey P ≤ 0.05..

respecta a la aplicación de los bioestimulantes, el quitosano (T1), el *Glomus cubense* (T2) y ácidos húmicos (T3) presentaron mayores rendimientos que el tratamiento control (T4). El promedio en que superaron los tratamientos al control fue de 1136.46 kg ha⁻¹ (Tabla 5). En lo referente a las interacciones el tratamiento V1T1 con la aplicación de Quitosano en la variedad Inivit registró el mayor rendimiento superando a los tratamientos V1T2, V1T3 y V2T1 con 745, 934.4 y 1341.5 kg ha⁻¹, pero sin diferir estadísticamente, el tratamiento de menor rendimiento fue V2T4 (control en variedad Racer).

En lo que se refiere a la variable peso del fruto, también se vio influenciado con la utilización de el *Glomus cubense*, este caso en la variedad Inivit, que obtuvo el mayor peso promedio de fruto frente a los demás promedios de las otras interacciones. La utilización de estos microorganismos resulta factible para cualquier sistema de producción agrícola debido a las funciones que realizan una vez que se asocian con las plantas; entre ellas encontramos: incremento en la absorción de nutrientes minerales y agua a partir de un aumento en el volumen de suelo explorado (Urgiles, 2019). El desarrollo de esta investigación permitió obtener resultados sobre la incidencia del quitosano, *Glomus cubense* y ácidos húmicos en el desarrollo del cultivo de pepino, desde la etapa de emergencia hasta la producción.

En este sentido Arias *et al.* (2012) mencionan que la inoculación de HMA en tomate, tuvo efecto en el rendimiento del cultivo y el número de frutos por planta, obtuvieron, que en los tratamientos inoculados los resultados fueron superiores comparados con el testigo, resultados similares a los de nuestra investigación. En el mismo sentido Sheikh y Malki (2011), mencionan que la aplicación de quitosano en frijol incremento el rendimiento y la calidad del ejote. Así mismo Sabreen *et al.* (2015), reportan incremento en el rendimiento y variables de crecimiento en calabaza, debido a procesos metabólicos en la interacción bioestimulante de los tratamientos a la semilla, el tipo de aplicación, y a la concentración utilizada. Por su parte Reyes *et al.* (2020) mencionan que el quitosano incrementa los rendimientos en tomate. En este mismo sentido Monirul *et al.* (2018) mencionan que con aplicación de quitosano en chile y tomate se encontró un nivel óptimo de rendimiento.

CONCLUSIONES

Las aplicaciones a base de quitosano y *Glomus cubense* influyeron, en el número de frutos, peso del fruto y rendimiento en ambas variedades.

La aplicación del bioestimulante a base de *Glomus cubense* presentaron incrementos en la emergencia, biomasa fresca, biomasa seca del cultivo de pepino.

La aplicación del bioestimulante a base de *Glomus cubense* en la variedad Inivit mostró el mayor peso fresco de planta a los 13 días después de la siembra, mientras que la aplicación de quitosano en la variedad Inivit generó el mayor rendimiento en pepino.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, por el apoyo otorgado a través del Fondo Competitivo de Investigación Científica y Tecnológica (FOCICYT) 6^a Convocatoria, a través del proyecto PFOC 6-20-2018 "Evaluación de derivados de Quitosano en la producción sostenible de hortalizas en sistema de cultivo orgánico".

REFERENCIAS

- Araujo, A. L., Rodríguez, A.C., & González, G.L.G. 2012. Efecto de la quitosana sobre el cultivo de tabaco (*Nicotiana tabacum* Lin.) en condiciones edafoclimáticas del municipio Guisa, Granma, Cuba. Revista UDO Agrícola. 12 (4):823-829.
- Arias, M. R., Romero, F., A., Bañuelos, T. J., & De la Cruz E. Y. 2019. Inoculación de hongos solubilizadores de fósforo y micorrizas arbusculares en plantas de jitomate. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 10(8):1747-1757.
- Baker, B.P., Green, T.A., & Loker, A.J. 2020. Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. Biological Control. 140: 1-9.
- Baldotto, L.E., Baldotto, M.A., Soares, R.R., Martinez, H.E., & Venegas, V.H. 2012. Adventitious rooting in cuttings of croton and hibiscus in response to indolbutyric acid and humic acid. Revista Ceres. 59(4): 476-483.

- Barrer, S. 2009. El uso de hongos micorrizicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 7(1):123-132.
- Basit, A., Khan, H., Alam, M., Ullah, I., Shah, S., Zuhair, S., & Ullah, I. 2020. Índices de calidad de la planta de tomate afectada por las condiciones de estrés hídrico y la aplicación de quitosano. *Pure Appl Biol*. 9: 1364-1375.
- Brown, P., & Saa, S. 2015. Biostimulants in agriculture. *Frontiers in plant science*. 6 (671):1-3.
- Calderón, P.A., Marrero, C.Y., Martín, C.J., & Mayo, I. 2013. La fertilidad de los suelos y su importancia en el empleo de bioproductos en la provincia de Sancti Spiritus. *Cultivos Tropicales*. 34(2): 16-23.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Jones, D.L., Nebbioso, A., Mazzei, P., & Piccolo, A. 2015. Ácidos húmicos y fúlvicos como bioestimulantes en horticultura. *Sci. Hortico*. 196: 15-27.
- Chen Y., De Nobili M., & Aviad T., 2004. Stimulatory effects of humic substances on plant growth. In: *Soil organic matter in sustainable agriculture* (Magdoff F., Weil R.R., eds). CRC Press, NY, USA.
- Domini, A.K. 2018. Potencialidades del quitosano para la fresa. Usos en la mejora y conservación de los frutos. *Cultivos Tropicales*. 39(1): 134-142.
- Doria, J. 2010. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*. 31(1):74-85.
- Ellis, R.H., & Roberts, E.H. 1980. Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany*. 45(1): 13-30.
- Eyheraguibel, B., Silvestre, J., & Morard, P. 2008. Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. *Bioresource Technology*. 99(10): 4206-4212.
- Flores, J. D. J., Villegas, A. Y., Castro, R. R., Gómez, V A., Carrillo, R. J., & Castañeda, H. E. 2020. Inoculación de avena forrajera con hongos micorrizicos arbusculares. *Revista Mexicana de Ciencias*. 24:191-199.
- Flores, G. J. E. 2017. Análisis económico de la producción de pepino (*Cucumis sativus* L.) híbrido thunder, en el centro de prácticas Manglaralto provincia de Santa Elena. Tesis de Grado. Universidad Estatal Península de Santa Elena. La Libertad (Ecuador).
- García, G. J., & Ocampo, J.A. 2002. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*. 53(373):1377-1386.
- González, L.G., Paz, I., Martínez, B., Jiménez, M.C., Torres, J.A., & Falcón, A. 2015. Respuesta agronómica del cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*, L) var. HA 3019 a la aplicación de quitosano. *UTCiencia Ciencia y Tecnología al servicio del pueblo*. 2(2): 55-60.
- Leiva, V. D. M. 2018. Eficacia de biofungicidas frente a la caída de plántula de pepino, inducida por *Pythium aphanidermatum*. *Revista de Investigación de Agroproducción Sustentable*. 2(1): 72-78.
- López, E. J., Huez L. M., Pacheco, A. F., Jiménez, L. J., & Preciado F. F. 2011. Productividad y calidad de dos cultivares de pepino en respuesta a la densidad de plantación. *Biotecnia*. 13(1): 23-28.
- Maguire, J.D. 1962. Velocidad de germinación: ayuda a la selección y evaluación de la emergencia y el vigor de las plántulas. *Crop Science*. 2(2): 176-177.
- Medina, G., L.R. 2016. La agricultura, la salinidad y los hongos micorrizicos arbusculares una necesidad, un problema y una alternativa. *Cultivos Tropicales*. 37(3): 42-49.
- Moreno, R.A., García, M. V., Reyes, C. J., Vásquez, A. J., & Cano, R.P. 2018. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Rev. Colomb. Biotecnol*. 20(1):68-83.
- Monirul, I., Humayun, KM, ANK, M. & Pronabananda, D. 2018. Estudios sobre rendimiento y atributos de rendimiento en tomate y chile mediante aplicación foliar de oligoquitosano. *Biological and Pharmaceutical sciences*. 3(3):20-28.
- Mujica, P., Y., & Fuentes, M., A.G. 2012. Efecto a la biofertilización con hongos micorrizicos arbusculares (HMA) en el cultivo del tomate en condiciones de estrés abiótico. *Cultivos Tropicales*. 33(4): 40-46.
- Musco, A., Sidari, M., & Nardi, S. 2013. Sustancia húmica: Relación entre estructura y actividad. La información más profunda sugiere hallazgos unívocos. *Revista de exploración geoquímica*. 129:57-63.
- Pichyangkura, R., & Chadchawan, S. 2015. Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Scientia Horticulturae*. 196: 49-65.
- Ramírez, G. M., Peñaranda, R. A., Pérez M. U., & Paola S. D. 2018. Biofertilización con hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) en especies forestales en vivero. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 16(2):15-25.
- Reyes, P. J. J., Luna, M. R., Reyes, B. M., Yépez, R. Á., Abasolo, P. F., Espinosa, C. K., López, B. R., Vázquez, M. V., Zambrano, B. D., Cabrera, B. D., & Torres, R. J. 2017. Uso del humus de lombriz y jacinto de agua sobre el crecimiento y desarrollo del pepino (*Cucumis sativus*, L). *Biotecnia*. 19 (2): 30-35.
- Reyes, P. J. J., Rivero, H.M., García, B. E. L., Beltrán, M. F. A., & Ruiz, E. F. H. 2020. Aplicación de quitosano incrementa la emergencia, crecimiento y rendimiento del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en condiciones de invernadero. *Biotecnia*. 22(3): 156-163.
- Rivera, R., Fernández, F., Hernández, A., Martín, J., & Fernández, K. 2003. El manejo efectivo de la simbiosis micorrizica, una vía hacia la agricultura sostenible. Estudio. Cuba: INCA.
- Sabreen, K.H., Ibraheim, A., & Mohsen, A.A. 2015. Effect of Chitosan and nitrogen rates on growth and productivity of summer squash plants. *Middle East Journal of Agriculture*. 4(4):673-681.
- Shehata, S., Fawzy, Z., & El-Ramady H. 2012. Respuesta de las plantas de pepino a la aplicación foliar de quitosano y levadura en condiciones de invernadero. *Revista australiana de ciencias básicas y aplicadas*. 4: 63-71.
- SIPA. 2018. Sistema de Información Pública Agropecuaria. Quito, Ecuador
- Sheikha, S.A., & Al-Malki, F.M. 2011. Growth and chlorophyll responses of bean plants to the chitosan applications. *European Journal of Scientific Research*. 50(1): 124-134.
- StatSoft Inc. 2018. Statistica. System reference. StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA.
- Torres, R. J.A., Reyes, P.J.J., González, G., L.G., Jiménez, Pizarro, M., Boicet, F.T., Enríquez, A.E.A., & González, R.J.C. 2018. Respuesta agronómica de dos variedades de maíz blanco (*Zea mays*, L.) a la aplicación de QuitoMax, Azofert y Ecomic. *Biotecnia*. 20(1):3-7.
- Urgiles, G. N., Lalangui, Z. C., Chamba, Q. E., Loján, P. A., Poma, L. L., Encalada, C. M., & Aguirre, M. N. 2019. Aislamiento y caracterización morfológica de Hongos Micorrizicos Arbusculares (HMA) de zonas riparias del Sur del Ecuador: un enfoque a la producción de biofertilizantes. *Revista del Centro de Estudio y Desarrollo de la Amazonia*. 9(1):1-7.
- Veobides, A. H., Guridi I. F., & Vázquez, P.V. 2018. Las sustancias húmicas como bioestimulantes de plantas bajo condiciones de estrés ambiental. *Cultivos Tropicales*. 39(4): 102-109.
- Vital, V. I., Quiñones, A.E., Hernández, M. L., & Rincón, E.G. 2018. Viabilidad de esporas de hongos micorrizicos arbusculares y semillas de girasol para el establecimiento de la simbiosis micorrizica. *Biotecnología y Sustentabilidad*. 3(2): 15-25.



Mathematical modeling for ethanol, methanol and acetaldehyde generation through Mexican carignane grape (*Vitis vinifera*) vinification process

Modelación matemática para la generación de etanol, metanol y acetaldeído durante el proceso de vinificación de uva Mexicana carignane (*Vitis vinifera*)

Norma Violeta Parra-Vergara¹, María Esther Parra-Durazo^{1,2}, Manuel Sánchez-Lucero¹, Armando Burgos-Hernández², Octavio Cota-Arriola³, Ofelia Rouzaud-Sandez², Carmen María López-Saiz^{3*}

¹ Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Apartado Postal 1658, Hermosillo, Sonora 83000, México

² Instituto del Manejo, Conservación y Procesamiento de Alimentos, Hermosillo, Sonora 83140, México

³ Environmental Engineering Program, Sonora State University, Hermosillo, Sonora, México.

ABSTRACT

Wine is a worldwide known beverage, and even though its consumption has been associated with the reduction of heart diseases and the extent of lifespan, it also has compounds that might cause adverse effects on human health such as methanol and acetaldehyde. The aim of this study was to determine the effect of time, temperature, and pectic enzymes over wine methanol and acetaldehyde concentrations during vinification. Three temperatures (20, 30, and 35 °C) and three pectic enzyme concentrations (0, 9, and 18 µL/Kg) were tested, allowing fermentation to stop due to sugar depletion. Both methanol and acetaldehyde were quantified throughout the fermentation process. Temperature reduced methanol production, observing the lowest methanol concentration (53.543 ± 3.267 mg/100 mL of wine) at 35 °C in the absence of pectic enzyme. Acetaldehyde was not affected by these variables. Alcohol, methanol, and acetaldehyde concentrations were adjusted to mathematical models with high correlations.

Keywords. Toxic compounds, wine, mathematical modeling, fermentation.

RESUMEN

El vino es una bebida conocida a nivel mundial, y aun cuando su consumo ha sido asociado a la reducción de enfermedades cardiacas y la extensión de la esperanza de vida, también posee compuestos que pueden tener efectos adversos a la salud humana tales como el metanol y el acetaldeído. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del tiempo, temperatura y la adición de enzimas pécticas en las concentraciones de metanol y acetaldeído durante el proceso de vinificación. Se utilizaron temperaturas (20, 30 y 35°C) y tres concentraciones de enzimas pécticas (0, 9 y 18 µL/Kg), dejando que la fermentación se detuviera por el agotamiento del azúcar. Tanto el metanol como el acetaldeído fueron cuantificados durante el proceso de fermentación. La temperatura redujo la producción del metanol, observándose la concentración más baja (53.543 ± 3.267 mg/100 mL de vino) a los 35°C en la ausencia de enzimas pécticas. El

acetaldeído no se ve afectado por las variables. Se ajustaron el alcohol, metanol y acetaldeído a modelación matemática con altos valores de correlación.

Palabras clave. Compuestos tóxicos, vino, modelación matemática, fermentación.

INTRODUCTION

Wine is a worldwide known beverage; in 2019, 258 millions of hectoliters were produced worldwide (OIV, 2019). Wine is the product of grape fermentation by different yeast species, mainly *Saccharomyces cerevisiae*; in this process, glucose and fructose are transformed mainly into ethanol and carbon dioxide, nevertheless, this is a much more complex process (Moreno-Arribas and Polo, 2009). There are over 500 different compounds that have been reported in wine, most of them are already present in grape, but some are generated during vinification process (Leighton and Urquiaga, 2000). As it is well known, some of these compounds have been associated to human health improvement, but the real effect has been a topic of discussion since these bioactive compounds are consumed along with ethanol (Iriti and Varoni, 2014), moderate consumption of red wine is associated with the reduction of heart disease and prolonged lifespan (Xiang et al., 2014).

On the other hand, there are other substances that in certain quantities may be considered toxic, such as arsenic and heavy metals, which are present in wine by grape contamination (Hu, 2002). Also, mycotoxins such as ochratoxin A, are products by fungal contamination, that can be found in wine and has been reported as a possible carcinogen for humans (IARC, 1993).

On the other hand, some toxic compounds that are produced during fermentation such as methanol and acetaldehyde. Methanol is a one-carbon alcohol that, at room temperature, is liquid and uncolored with a soft smell (Cabaroğlu, 2005). During wine production, methanol is first found directly bound to pectic substances in grape and, during fermentation, these substances undergo an enzymatic degradation process, leading to the formation of methanol,

*Autor para correspondencia: Carmen María López Saiz
Correo electrónico: carmen.lopezsaiz@unison.mx

Recibido: 2 de febrero de 2021

Aceptado: 2 de junio de 2021

whose concentration has been directly associated with the use of pectinesterase, polygalacturonase, and pectinase enzyme (Andraous *et al.*, 2004). These enzymes are usually applied to enhance color and produce phenolic compounds in wine (Wightman and Wrolstad, 1996). On the other hand, acetaldehyde is also produced by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation as a by-product during pyruvate glycolytic fermentation (Herrero *et al.*, 2003). Also, even though acetaldehyde is considered as a component of a high quality wine (Romano *et al.*, 1994), the International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified it into the 2B category as a probable carcinogenic agent (IARC, 1999). Based on the above, the present research work explore the way these compounds are affected by vinification process variables, an issue that is highly important for the wine industry.

Considering this information, this study aimed to mathematically determine the effect of time, temperature, and pectic enzyme used, on methanol and acetaldehyde production.

MATERIALS AND METHODS

Testing species

Carignane red grape (*Vitis vinifera*) was obtained from local vineyards in Hermosillo, Sonora, México, and transported to the laboratory. For each experiment, 20 Kg-sample of grapes, cleaned and milled in an equipment designed and built specially for the fermentation laboratory were used. A 200 mL-aliqout of grape juice was taken and then prepared with the addition of 0.16 mg of commercial yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and 0.40 mg sodium phosphate (to a final concentration of 20 µg/Kg). While grape juice was being prepared, milled grape was treated with pectic enzyme at different concentrations (0, 9, and 18 µL/Kg) in order to enhance the breaking of pectin bondages and the release of juice.

Grape broth and milled grape were combined after 4 h and stirred for 2 min to homogenize the mixture. Then, the grape was pressed using a lab-scale designed and built equipment to separate solids from the liquid phase. Juice was then filtered (grape must) and placed on a lab-designed fermenter and set at different temperatures (20, 30, and 35 °C), selected according to the optimum temperature range for the yeast strain. At this time, a sample was taken from each set of treatments in order to carry out all the analysis at $t = 0$ min.

Fermenter design

Lab-scale fermenters were designed and built, to have controlled conditions for the vinification process. Three fermenters were built up with stainless steel (recommended material for fermentations according to Vine *et al.* (2002)), in order to have three replicates for each treatment. Fermenters were 35 cm tall with 28 cm of internal diameter. The container lids were adaptable to the fermenters and closed with the aid of screws to simulate a tank. The cover had an electrical stirrer working at 80 rpm when needed. On the cover of the container, a vent was set to allow the expulsion

of fermentation gases. An installed thermocouple monitored the fermentation temperature. Fermenters were placed at a room with controlled temperature.

Sugar measurement

Sugar was measured indirectly with a digital refractometer (HI 96801, Hanna Instruments, USA) (Greer and Weedon, 2013), at 20 °C.

Alcohol volume percentage

The amount of alcohol was determined calculating the volume of alcohol in 100 mL of a hydroalcoholic sample. This was accomplished by distilling musts and wines and collecting the alcohols. Once recovered all the alcohol, distilled samples were cooled down to 20 °C and measured with calibrated alcoholmeters.

Methanol and acetaldehyde analysis by gas chromatography

Quantification of methanol and acetaldehyde was carried out by gas chromatography using an HP 5890 series II gas chromatographer equipped with a capilar carbowax HP column (0.25 mm i.d.). A flame ionizing detector, N₂ as a carrier gas, and 2-pentanol as internal standard, were used.

Analytical curves for methanol and acetaldehyde were done using external standards, prepared by dilution of a stock solution in tri-distilled water.

Distilled samples were used to determine the concentration of acetaldehyde and methanol, which were calculated according to the standard curve.

Experimental Design

Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) with Tukey-Kramer and Duncan's multiple comparison test (JMP 5.1). Grape must was subjected to three fermentation temperatures (15, 25, and 35 °C) and three pectic enzyme concentrations were used (0, 9, and 18 µL/Kg).

Statistical analysis

Data were analyzed using an analysis of variance (ANOVA) with Tukey-Kramer and Duncan's multiple comparison tests (Number Cruncher Statistical Software (NCSS 2000)). Mathematical models were determined with JMP 5.1.

RESULTS AND DISCUSSION

Data analysis was carried out to describe fermentation behavior through de description of sugar concentration, alcohol production, and acetaldehyde and methanol production throughout the vinification process, as well as to determine how these variables were affected by temperature and pectic enzyme concentration.

Fermentation

Carignane grape was fermented under three different temperature conditions, as described in the experimental section. Temperature was monitored, and it was kept at

20.02 ± 1.12, 30.22 ± 1.73 and 35.02 ± 2.2 °C; as expected, the time of fermentation was temperature dependent, and they lasted 117, 42 and 28 h at 25, 30, and 35 °C, respectively. This variation is attributed to the activity and reproduction of *Saccharomyces cerevisiae*, whose metabolism is temperature-dependent, having an optimum temperature of 37 °C (Mesonides *et al.*, 2002).

In order to monitor fermentation variables (alcohol volume (%), methanol, and acetaldehyde), samples were taken every 12, 6, and 4 h for 20, 30, and 35 °C, respectively.

Sugar consumption

The initial amount of fermentable sugar, measured in °Brix, was within the range of 17.0 and 17.8; which were within the recommended range for wine (Vine *et al.*, 2002). The reduction of fermentable sugar was periodically measured, depending on the temperature. Samples were taken every 6, 3, and 2 h. The mathematical fit of °Brix reduction was described with a natural logarithm, using time as the nondependent variable and °Bx as the dependent variable (Table 1); all mathematical fits described fermentation behaviors with high correlation values.

Table 1. Mathematical fits for °Bx reduction in Carignane grape fermentation.

Tabla 1. Ajuste matemático para la reducción de °Bx en la fermentación de uva Carignane.

Temperature (°C)	Mathematical fit	R ²
20	°Bx=34.06—7.19ln(t)	0.9888
30	°Bx=40.59—10.59ln(t)	0.9980
35	°Bx=36.15—10.93ln(t)	0.9979

Mathematical variables °Bx and t represent amount of sugar and time (h), respectively. Mathematical fits were calculated with the data obtained from 9 separate fermentations. Mathematical formula and correlation was given by the mathematical program.

Alcohol production

Alcohol content is expressed as alc/vol, mainly represents the production of ethanol, since this is the alcohol produced in the highest percentage and constitutes the main purpose of fermentation (Delfini and Formica, 2001). Alcohol production was dependent on sugar concentration, oscillating between 8.6 and 9.3 alc/vol; nonetheless, the amount °Bx necessary to increase 1 % the amount of alcohol did not show statistical difference among them (Table 2), showing that this variable is not temperature nor pectic enzyme dependent.

Ideally, for every mol of glucose, 2 moles of ethanol and 2 moles of carbon dioxide are produced; nevertheless, the real amount produced varies (Morales *et al.*, 2015). A mathematical fit for the final production of alcohol according to the °Bx content on grape was calculated with a R² of 0.990 as follows:

$$\%AV = -0.0198 + 0.52^{\circ}Bx$$

Table 2. °Bx necessary to increase 1 % the alc/vol relationship.
Tabla 2. °Bx necesarios para incrementar en 1 % la relación alc/vol.

Temperature (°C)	Pectic enzyme (µL/Kg)	°Bx/alc-vol
20	0	1.906 ± 0.012 ^a
	9	1.906 ± 0.012 ^a
	18	1.941 ± 0.012 ^a
30	0	1.918 ± 0.065 ^a
	9	1.896 ± 0.051 ^a
	18	1.945 ± 0.043 ^a
35	0	1.943 ± 0.038 ^a
	9	1.943 ± 0.022 ^a
	18	1.928 ± 0.033 ^a

Data represents the mean ± standard deviation out of three independent experiments. Different letters represent statistical difference.

Where:

- %AV is the final concentration of alcohol-volume
- °Bx the amount of Brix in grape

In order to describe the fermentation process, mathematical fits were calculated for every temperature, associating the amount of alcohol produced (alc/vol) to the fermentation time (Table 3).

Table 3. Mathematical fits for alc/vol production in Carignane grape fermentation.

Tabla 3. Ajuste matemático para la producción de alc/vol en la fermentación de uva Carignane.

Temperature (°C)	Mathematical fit	R ²
20	AV ₂₀ = 3.2x10 ⁻³ + 0.16 t — 7.0x10 ⁻³ t ²	0.9888
30	AV ₂₀ = 2.9x10 ⁻³ + 0.28 t — 1.3x10 ⁻³ t ²	0.9980
35	AV ₂₀ = 7.8x10 ⁻³ + 0.38 t — 2.3x10 ⁻³ t ²	0.9979

Mathematical variables °Bx and t represent amount of sugar and time (h), respectively. Mathematical fits were calculated with the data obtained from 9 independent fermentations. Mathematical formula and correlation were given by the mathematical program.

Methanol Production

Methanol production was monitored during fermentation, and data expressed as fermentation progress (%FP), was calculated with the formula:

$$\%FP = \left(1 - \frac{^{\circ}Bx_0 - ^{\circ}Bx_t}{^{\circ}Bx_0} \right) \times 100$$

Where:

- %FP represents fermentation progress
- is Bx₀ vthe initial °Brix value on grape
- is Bx_t the°Brix value at a given time

This transformation was used as a dependent variable instead of time; this transformation allowed us to compare the amount of methanol at any given fermentation progress since fermentation time was different for each temperature. All fermentation showed an exponential behavior, where the maximum concentration was achieved at the beginning of

the fermentation and was maintained during the rest of the process. Final methanol concentrations (Figure 1) demonstrate that both, temperature and enzyme concentration, exert an effect on this variable. The lowest concentrations were obtained at 35 °C with no addition of pectic enzyme, while the highest were at 20 °C; however, no significant differences were observed among methanol concentrations obtained at 30 °C. The effect of enzyme addition is only significant at 35 °C, this might be due to the fact that *Saccharomyces cerevisiae* exerts its highest activity at 37 °C (Mesonides *et al.*, 2002) and can produce pectinesterase enzyme. This specific enzyme has a higher optimum temperature than commercial enzymes (Jayani *et al.*, 2005), and this production could be enough to promote an increase in methanol generation.

None of the fermentation processes generated methanol concentrations above the permitted levels established by international regulations (EEC, 2008), which is 200 mg/100 mL; this means that, regarding the amount of methanol, wine consumption (under experimental conditions) would not represent a health risk. These results are in agreement with those reported by Coelho *et al.*, (2015), who fermented different fruits to obtain fruit wines.

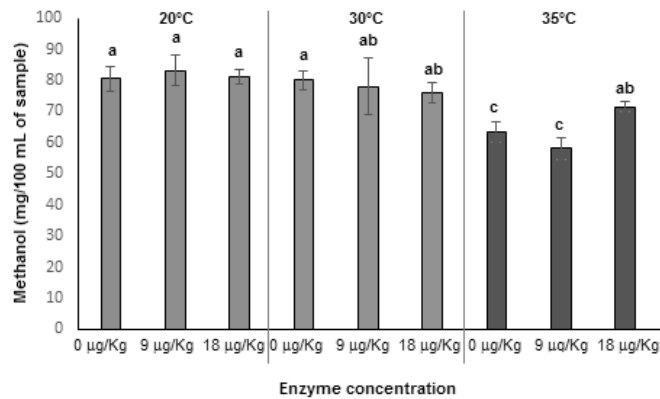


Figure 1. Temperature and pectic enzyme concentration effect on wine methanol concentration. Data represents the mean ± standard deviation of three independent experiments. Different letters represent statistical difference

Figura 1. Efecto de la temperatura y la concentración de enzimas pécticas en la concentración de metanol en vino. Los datos representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras representan diferencia significativa.

Acetaldehyde production

Acetaldehyde was also monitored along the fermentation process. The final acetaldehyde concentration was not temperature, nor enzyme concentration dependent (Table 4). This compound might be formed in wine by two different processes; the first one is glycolysis performed by *Saccharomyces cerevisiae* (Romano *et al.*, 1994), the other one is through oxidation of ethanol when this interacts with phenolic compounds and oxygen (Saucier *et al.*, 1997). Even though acetaldehyde final concentration achieved in this study does not represent a hazard for human health (since national and international legislation establish the higher limit for acetaldehyde at 40 mg/ 100 mL of wine), the acetal-

able 4. Temperature and pectic enzyme concentration effect on wine methanol concentration.

Tabla 4. Efecto de la temperatura y concentración de enzimas pécticas en la concentración de metanol en el vino.

Temperature (°C)	Enzyme concentration (µL/Kg of grape)	Methanol (mg/100mL of wine)
20	0	6.02 ± 2.35 ^a
	9	3.67 ± 2.79 ^a
	18	5.63 ± 1.35 ^a
30	0	5.52 ± 2.11 ^a
	9	4.11 ± 1.78 ^a
	18	6.34 ± 0.52 ^a
35	0	6.42 ± 2.66 ^a
	9	4.77 ± 2.01 ^a
	18	6.41 ± 1.37 ^a

Data represents the mean ± standard deviation of three separate experiments. Different letters represent statistical difference

dehyde concentration through experimental fermentation process was 35 mg/100 mL at 35 °C.

This high acetaldehyde concentration may be due to enzyme activity of *Saccharomyces cerevisiae*, which shows its highest activity at 37 °C (Mesonides *et al.*, 2002). Therefore, acetaldehyde production behavior was shown to be time dependent, and it can be described in a plot, starting at 0 mg/100 mL. It achieves the highest concentration at the middle of the fermentation process, and then decreasing to low concentrations; this phenomena might be due acetaldehyde evaporation, which has a boiling point of 21 °C (Figure 2) (Mauer and Welle, 2008).

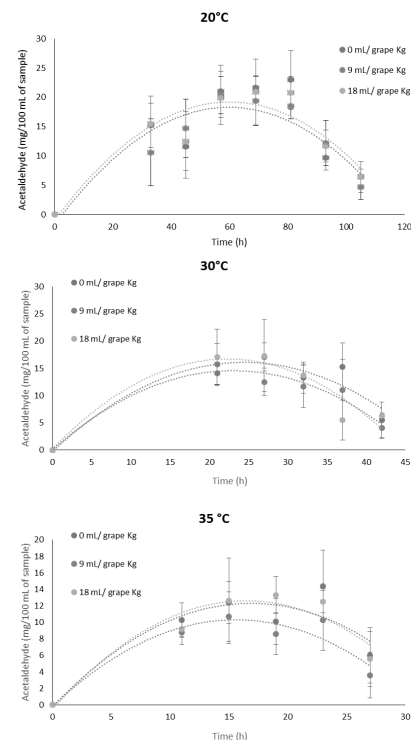


Figure 2. Acetaldehyde concentration through vinification process influenced by temperature and pectic enzyme concentration.

Figura 2. Concentración de acetaldehído durante el proceso de vinificación influenciado por temperatura y concentración de enzimas pécticas.

The behavior of the production of both, methanol and acetaldehyde, during the experimental fermentation processes can be mathematically described (Table 5), where methanol production can be obtained with an exponential equation, with fermentation percentage as the independent variable and methanol concentration measured, as mg/100 mL of sample, as the independent variable. On the other hand, acetaldehyde follows a quadratic behavior where the independent variable is time and the dependent variable is acetaldehyde concentration measured in mg/100 mL of sample.

Table 5. Mathematical fit to describe the production of acetaldehyde and methanol compounds on vinification process.

Tabla 5. Ajuste matemático para describir la producción de acetaldehído y metanol en el proceso de vinificación.

Temp. (°C)	Enzyme (μL/Kg)	Acetaldehyde	R ²	Methanol	R ²
20	0	$Ac=1.18+1.06 t-0.009 t^2$	0.817	$Met = 24.24(1-e^{-0.062F})$	0.9851
	9	$Ac=-0.03+1.03 t-0.009 t^2$	0.9918	$Met = 26.13(1-e^{-0.039F})$	0.9583
	18	$Ac=1.18+0.96 t-0.008 t^2$	0.867	$Met = 25.92(1-e^{-0.062F})$	0.9931
30	0	$Ac=0.34+2.25 t-0.005 t^2$	0.7621	$Met = 25.16(1-e^{-0.037F})$	0.9988
	9	$Ac=0.75+2.3 t-0.05 t^2$	0.8314	$Met = 24.46(1-e^{-0.046F})$	0.9907
	18	$Ac=0.68+2.43 t-0.05 t^2$	0.9299	$Met = 24.12(1-e^{-0.062F})$	0.9997
35	0	$Ac=0.34+2.25 t-0.05 t^2$	0.8619	$Met = 18.59(1-e^{-0.064F})$	0.9878
	9	$Ac=0.75+2.33 t-0.05 t^2$	0.8475	$Met = 19.05(1-e^{-0.067F})$	0.9997
	18	$Ac=0.68+2.43 t-0.05 t^2$	0.9290	$Met = 21.44(1-e^{-0.062F})$	0.9954

CONCLUSIONS

In this research, under experimental fermentation conditions, the achieved concentration for both compounds is below the recommended levels for wine. Methanol concentration is time, temperature, and enzyme dependent, while acetaldehyde depends only on time. The fermentable sugars reduction and the alcohol, methanol, and acetaldehyde production, can be described through mathematical models with a high correlation coefficient, and even though sugar depletion and alcohol production have been mathematically described before, to our knowledge, there are no previous methanol and acetaldehyde mathematical modeling approaches reported.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledge the National Council for Science and Technology (CONACyT) of México for graduated scholarship granted to Carmen-María López-Saiz and María-Esther Parra-Durazo. The authors would also like to thank Industrias Vinícolas Pedro Domecq for the financial support and especially to Dr. Rafael Ayala and Juan Pablo Villegas for their technical support.

REFERENCES

- Andraous, J. I., Claus, M. J., Lindemann, D. J., Berglund, K. A. 2004. Effect of liquefaction enzymes on methanol concentration of distilled fruit spirits. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(2), 199-205.
- Cabaroglu, T. 2005. Methanol contents of Turkish varietal wines and effect of processing. *Food Control*, 16, 177-178.
- Coelho, E., Vilanova, M., Genisheva, Z., Oliveira, J. M., Teixeira, J. A., Domingues, L. 2015. Systematic approach for the development of fruit wines from industrially processed

fruit concentrates, including optimization of fermentation parameters, chemical characterization and sensory evaluation. *LWT - Food Science and Technology*, 62, 1043-1052.

- Delfini, C., Formica, J. 2001. *Wine microbiology: science and technology*. Italia: L'artistica savigliano.
- Regulation (EC) No 110/2008 of the European Parliament and the Council, [Consultada el XX de 2008] 2008. Disponible en: [http://data.europa.eu/eli/reg/2008/110\(1\)/oj](http://data.europa.eu/eli/reg/2008/110(1)/oj).
- Greer, D. H., Weedon, M. M. 2013. The impact of high temperatures on *Vitis vinifera* cv. Semillon grapevine performance and berry ripening. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1-3.
- Herrero, M., García, L. A., Díaz, M. 2003. The effect of SO₂ on the production of ethanol, acetaldehyde, organic acids, and flavor volatiles during industrial cider fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3455-3459.
- Hu, H. 2002. *Human health and heavy metal exposure*. USA: MIT Press.
- IARC. 1993. Ochratoxin A IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to Humans (Vol. 56, pp. 489-521): IARC.
- IARC. 1999. Acetaldehyde IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human (Vol. 71, pp. 319): IARC.
- Iriti, M., Varoni, E. 2014. Cardioprotective effects of moderate red wine consumption: Polyphenols vs. ethanol. *Journal of Applied Biomedicine*, 12(4), 193-202. doi:10.1016/j.jab.2014.09.003
- Jayani, R., Saxena, S., Gupta, R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40, 2931-2944.
- Leighton, F., Urquiaga, I. 2000. Polifenoles del vino y salud humana. *Antioxidantes y Calidad humana*, 7, 5-13.
- Mauer, A., Welle, F. 2008. *Investigation of the acetaldehyde content of PET raw materials, PET preforms and PET bottles*. Prague: Institut Verfahrenstechnik und Verpackung.
- Mesonides, F., Schuurmans, J., Joost, M., Hellingwerf, K., Brul, S. 2002. The metabolic response of *Saccharomyces cerevisiae* to continuous heat stress. *Molecular Biology Reports*, 29(1-2), 103-106.
- Morales, P., Rojas, V., Quirós, M., González, R. 2015. The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mixed starter culture. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 99, 3993-4003.
- Moreno-Arribas, V., Polo, C. 2009. *Wine Chemistry and Biochemistry*. USA: Springer.
- OIV. 2019. 2020 Wine Production OIV first estimates. International Organisation of Vine and Wine.
- Romano, P., Suzzi, G., Turbanti, L., Polsinelli, M. 1994. Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 118, 213-218.
- Saucier, C., Bourgeois, G., Vitro, C., Roux, D., Glories, Y. 1997. Characterization of (+)-catechin-acetaldehyde polymers: a model for colloidal state of wine polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1045-1049.
- Vine, R., Harkness, E., Lintora, S. 2002. *Winemaking. From grape growing to market place*. USA: Kluwer academic/Plenum publishers.
- Wightman, J. D., Wrolstad, R. E. 1996. Beta-glucosidase activity in juice-processing enzymes based on anthocyanin analysis. *Journal of Food Science*, 61, 544-552.
- Xiang, L., Xiao, L., Wang, Y., Li, H., Huang, Z., He, X. 2014. Health benefits of wine: Don't expect resveratrol too much. *Food Chemistry*, 156, 258-263. doi:10.1016/j.foodchem.2014.01.006



Effect of dietary prebiotic inulin and probiotic *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus sp.*, on the intestinal microbiota of white shrimp *Litopenaeus vannamei*

Efecto de la inclusión de inulina (prebiótico) y *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus sp.* (probiótico) en el alimento, sobre la microbiota intestinal del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*

Cristina Escobedo-Fregoso¹, Eduardo Quiroz-Guzmán¹, Gabriela Mendoza-Carrion², Alberto Peña-Rodríguez^{1*}

¹ CONACYT – CIBNOR, S.C., Instituto Politécnico Nacional 195, La Paz, B.C.S. 23096, Mexico.

² Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, B.C.S., 23096, Mexico.

ABSTRACT

Juvenile *Litopenaeus vannamei* (1.05 ± 0.1 g) were fed during a 4-week period with four experimental diets: control (Ctrl), inulin as prebiotic (5 g kg⁻¹) (Pre), *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus sp.* as probiotic (1 × 10⁵ CFU g⁻¹) (Pro), and a mix of inulin + *B. subtilis* and *Lactobacillus sp.* (5 g kg⁻¹ + 1 × 10⁵ CFU g⁻¹) (Syn). Syn diet fed shrimps showed a significantly better utilization of feed and higher growth than those in control diet ($P < 0.05$). The probiotic employed induced higher intestinal bacterial richness, whereas inulin induced higher bacterial diversity in shrimp intestine. The most dominant bacterial phylum in the shrimp intestine among treatments was *Proteobacteria* with an abundance ranging between 80 and 84 %. Prebiotic diet (Pre) increased relative abundance of *Firmicutes* in shrimp intestine (2 %) compared to the rest of the treatments (0.6 %). When probiotics were included in the feed (Pro and Syn), a reduction between 3 and 13 % in the relative abundance of *Vibrio sp.* in shrimp intestine was observed with respect to the control treatment, which represent an advantage to control potential pathogens of this genus.

Keywords: Functional feed, Shrimp, Bacterial modulation.

RESUMEN

Juveniles de *Litopenaeus vannamei* (1.05 ± 0.1 g) fueron alimentados durante cuatro semanas con cuatro dietas experimentales: control (Ctrl), inulina como prebiótico (5 g kg⁻¹) (Pre), *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus sp.* como probiótico (1 × 10⁵ UFC g⁻¹) (Pro), y una mezcla de inulina + *B. subtilis* y *Lactobacillus sp.* (5 g kg⁻¹ + 1 × 10⁵ UFC g⁻¹) (Syn). Los camarones con la dieta Syn resultaron en un crecimiento significativamente mayor y una mejor eficiencia de utilización del alimento que los camarones control ($P < 0.05$). El probiótico empleado indujo una mayor riqueza bacteriana intestinal, mientras que la inulina resultó en una mayor diversidad bacteriana en el intestino del camarón. A nivel de filo, *Proteobacteria* fue el más dominante en todos los tratamientos, entre 80 y el 84 %. La dieta Pre aumentó la abundancia relativa de *Firmicutes* en el camarón (2 %) en comparación con el resto de los tratamientos (0.6 %). El uso del probiótico (Pro y Syn), resultó en una reducción de entre 3 y 13 % en la abundancia relativa de *Vibrio sp.* en intestino de camarón respecto al tratamiento control, que representa una ventaja para el control

de potenciales patógenos de este género.

Palabras clave: Alimentos funcionales, Camarón, Modulación bacteriana.

INTRODUCTION

The rapid worldwide expansion of farmed shrimp has faced different challenges in terms of pathogen outbreaks and demand for functional feeds that promote optimal growth and health. In the past decades, the control of shrimp diseases has been through chemicals and antibiotics; however, their indiscriminate use, as preventive strategy, resulted in the resistance by pathogens and environmental problems (Martinez, 2009). In different studies, the use of probiotics, natural prebiotics and synbiotics (combination of probiotics and prebiotics) added to the feed or in the culture water conferred health benefits to the host (Hai, 2015; Ringø *et al.*, 2010; Olmos *et al.*, 2020). Furthermore, this has been proposed to replace the use of chemicals and antibiotics to control and prevent shrimp diseases (Luna-González *et al.*, 2012; Jamal *et al.*, 2019; Partida-Arangure *et al.*, 2013).

In the case of probiotics, some criteria to select beneficial microorganisms are the mode of action to enhance the immune response, production of inhibitory compounds to exclude pathogens, growth enhancement and improvement of water quality (Kesarcodei-Watson *et al.*, 2008; Verschuere *et al.*, 2000). Another determinant factor in the effectiveness of probiotics in aquaculture, is the origin of the microorganisms employed, where non-native bacteria from the marine environment may have poor success (Ninawe and Selvin, 2009) or represent a risk for the marine microbial ecology (Vargas-Albores *et al.*, 2017). It has also been suggested that multiple probiotic strains have better results than a single probiotic strain in relation to growth and health of shrimp (Wang *et al.*, 2019). Two of the most studied bacterial genus employed as probiotics for farmed shrimp are *Bacillus* and *Lactobacillus*, which have been described to improve shrimp growth when supplemented in the feed (Kongnum and Hongpattarakere, 2012; Zheng *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019). This is attributed in part to an increase in digestive enzymes activity (Liu *et al.*, 2009; Zheng and Wang, 2017; Zhou *et al.*, 2009). In addition, the administration of *Bacillus sp.* to water has been considered to improve survival rate and growth of shrimp larvae and water quality (Liu *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2009). The use of

*Autor para correspondencia: Alberto Peña Rodríguez
Correo electrónico: apena@cibnor.mx

Recibido: 17 de febrero 2021

Aceptado: 17 de mayo de 2021

Lactobacillus sp. and *Bacillus subtilis* as probiotics, has also proved to protect against pathogenic bacteria in shrimp (Balcázar and Rojas-Luna, 2007) and brine shrimp culture (Quiroz-Guzmán *et al.*, 2018).

On the other hand, prebiotics are non-digestible complex carbohydrates that promotes growth of beneficial bacteria in the intestinal tract of the host (Manning and Gibson, 2004). Among prebiotics used in shrimp diets, inulin may promote shrimp growth (Zhou *et al.*, 2020) as well as the immune defense in infected shrimp (Luna-González *et al.*, 2012; Partida-Arangure *et al.*, 2013). The mix of different probiotics and prebiotics (synbiotics) included in shrimp feed has also shown improvement on growth, feed conversion ratio (FCR), and the immune response (Wongsasak *et al.*, 2015; Zubaidah *et al.*, 2015).

Microorganisms contribute to the biosecurity, nutrition, animal health, and other management aspects that are crucial in productivity of shrimp culture ponds (Kumar *et al.*, 2015; Martínez-Córdova *et al.*, 2015). Nevertheless, the lack of capacities for the culture of most bacteria species makes difficult the study of microbial communities and their interaction with the host (Rashid and Stingl, 2015). The knowledge of how prebiotics and probiotics, or a mix of them, influence bacterial communities in shrimp gut is scarce. However, the probiotics and prebiotics in shrimp culture promote differential gastrointestinal communities compared to basal diets (Li *et al.*, 2007; Vargas-Albores *et al.*, 2017), increasing bacterial population and diversity, and, in some cases, promoting intestinal colonization of the probiotic employed (Wongsasak *et al.*, 2015; Zubaidah *et al.*, 2015). Different studies revealed that *Vibrionaceae* are ubiquitous in aquatic environments including culture ponds (Alagappan *et al.*, 2010; Thompson *et al.*, 2004), and considered causal agents of a major disease that causes high mortalities of farmed shrimps, including *Litopenaeus vannamei* (Novriadi, 2016; Zhou *et al.*, 2012).

Using 16S rRNA next-generation sequencing, this study aims to contribute to the understanding of the impact and importance of prebiotics, probiotics or synbiotics in feed on the intestinal bacterial communities of the white shrimp *L. vannamei*.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and encapsulation

The probiotic bacteria *Bacillus subtilis* (BSB) (Balcázar and Rojas-Luna, 2007) and *Lactobacillus sp.* (Cb-Lta) (García-Rodríguez 2003) were previously isolated from farmed *L. vannamei*. Both strains were grown on marine agar (MA) plates (seawater at 0.5 % meat peptone, 0.1 % yeast extract, and 1.7 % agar), at 35 °C during 24 h. The optical density of each bacteria was adjusted in a 2.5 % NaCl buffer to 1 at 600 nm ($OD_{600} = 1$) using a BioPhotometer (Eppendorf D30, NY, USA), to standardize the number of bacteria at $\sim 1 \times 10^7$ CFU mL⁻¹. The probiotics encapsulation was performed by mixing equal parts of both bacteria in a sterile solution of 2 % low viscosity alginic sodium (Sigma Aldrich). The mixture was added dropwise using a syringe (0.55-mm diameter) into

a 2 % CaCl₂ solution while stirring magnetically. After filtered and washed with distilled water, capsules were stored at 4 °C in a sterile flask.

Experimental diets

Four balanced experimental diets were formulated for shrimp: a control diet (Ctrl), a prebiotic diet with inulin included at 0.5 % (Pre), the third diet with the encapsulated probiotic at a final concentration of 1×10^5 CFU g⁻¹ of each bacteria (Pro), and finally a synbiotic diet containing the same ratio of both prebiotic and probiotic (Syn) (Table 1). Manufactured diets were prepared as follows: all dry ingredients, including probiotic and prebiotic if applicable, were mixed (KitchenAid® 4.7 L mixer, Michigan, US) to obtain a homogeneous blend, followed by the incorporation of the oil-based ingredients and remixed. Then, distilled water was incorpo-

Table 1. Ingredients and proximate composition of experimental diets.

Tabla 1. Ingredientes y composición proximal de los alimentos experimentales.

Ingredients (g kg ⁻¹ as is)	Experimental feeds			
	Ctrl	Pre	Pro	Syn
Fish meal ^a	220	220	220	220
Soybean meal ^b	304	304	304	304
Wheat meal ^c	392.4	387.4	392	387
Fish oil ^a	25	25	25	25
Soy lecithin ^d	35	35	35	35
Carboxymethyl cellulose ^e	15	15	15	15
Vitamin-mineral premix ^f	5.3	5.3	5.3	5.3
Vitamin C ^g	1	1	1	1
Choline Chloride ^h	1.5	1.5	1.5	1.5
Sodium phosphate, dibasic ^h	0.5	0.5	0.5	0.5
Antioxidant BHT ^h	0.3	0.3	0.3	0.3
Inulin (prebiotic) ⁱ	0	5	0	5
Bacillus:Lactobacillus (probiotic)	0	0	0.4	0.4
Proximate composition (g 100 g ⁻¹ dry matter ± SD)				
Dry matter	91.7±0.5	91.5±0.4	91.3±0.5	91.8±0.3
Protein	38.1±0.2	37.9±0.1	37.8±0.2	37.9±0.1
Lipids	7.9±0.1	7.9±0.1	8.0±0.1	8.0±0.1
Crude fiber	1.2±0.04	1.5±0.06	1.2±0.03	1.5±0.06
Ash	8.4±0.03	8.4±0.03	8.4±0.01	8.4±0.03
NFE ^j	44.3	44.3	44.6	44.2

^a PMA S.A. de C.V., Jalisco, MX.

^b PIASA S.A. de C.V., Baja California Sur, MX.

^c Molino San Cristóbal, Sonora, MX.

^d Suministros AZ, Baja California Sur, MX.

^e IMSA SA de CV, Mexico City, MX.

^f Vitamin-mineral premix: detailed content in Elizondo-González *et al.* (2018)

^g Rovimix Stay C 35%, DSM, Heerlen, NL.

^h Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, US.

ⁱ Casa Alma de Provinciana, Jalisco, MX.

^j Nitrogen-free extract
SD: standard deviation.

rated and homogenized ($\sim 350 \text{ mL kg}^{-1}$), and finally passed through a 2-mm die (Torrey® M-12-FS, Nuevo Leon, MX). The pelleted diets were dried in an oven at $35 \text{ }^\circ\text{C}$ for 12 h ($\sim 10 \%$ moisture) and kept in plastic bags at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ until further use. Proximate composition analysis of shrimp diets was conducted as follows: dry matter was estimated by gravimetric analysis using a force-air oven at $100 \text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h (Method 930.15; AOAC, 2005). The crude protein content was estimated by the Dumas combustion method (Ebeling, 1968) with a LECO® FP-528 analyzer (LECO Inc., Michigan, US). The ether extract content was determined using a micro Foss Soxtec® Avanti 2050 (Foss, Hoganäs, SE) (Method 2003.05; AOAC, 2005). Ash content was analyzed gravimetrically at $550 \text{ }^\circ\text{C}$ for 6 h with a furnace (Method 942.05; AOAC, 2005). Crude fiber (Method 978.10; AOAC, 2005) was determined using a Fibre Tec® M6 System (Foss, Hoganäs, SE). Nitrogen-free extract (NFE) was estimated by difference (100% less the percentages of lipids, crude protein, ash and crude fiber). Gross energy was analyzed with an adiabatic calorimeter (Parr Instruments, model 1261, Illinois, US). All experimental diets presented similar protein, lipid, and ash contents with a slight increase of crude fiber when inulin was included (Pre and Syn diets) (Table 1).

Feeding trial

Juvenile shrimp *L. vannamei* were kindly donated by Larvas Gran Mar, S.A. de C.V. (Baja California Sur, Mexico), acclimated to laboratory indoor conditions ($28 \pm 0.6 \text{ }^\circ\text{C}$, $> 4 \text{ mg L}^{-1}$ DO, 16:8 h dark:light photoperiod and 37 ‰ salinity) for one week prior feeding trial. Experimental dietary treatments were evaluated by triplicate during 28 days; each replicate corresponded to a 50-L aerated fiberglass tank containing 10 shrimps (initial avg. wt. of $1.05 \pm 0.1 \text{ g}$). Shrimps were fed to satiety for all treatments with two initial rations corresponding to 5 % of shrimp biomass (09:00 and 15:00 h). Every day, the feed ration was adjusted according to consumption in each tank. Every day 50% water was exchanged, to keep water parameters of dissolved oxygen ($4 \pm 1.1 \text{ mg L}^{-1}$) and temperature ($28 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$) which were measured daily with a multiparameter YSI model 85. Twice a week, pH (7.9 ± 0.1) was analyzed using a Bluelab® pHmeter, and $\text{NH}_3\text{-N}$ ($< 0.25 \text{ mg L}^{-1}$), NO_2^- ($< 0.5 \text{ mg L}^{-1}$), and NO_3^- ($< 0.5 \text{ mg L}^{-1}$) were measured with an API® saltwater colorimetric kit. At the end of the feeding trial, shrimp performance was evaluated in terms of percentage of growth, specific growth rate (SGR), and percentage of survival; feed efficiency utilization was evaluated as feed conversion ratio (FCR) and protein efficiency ratio (PER).

The results of shrimp performance parameters were evaluated for normality (Shapiro-Wilk test) and homoscedasticity (Levene's test) using the software SPSS Statistics version 17.0. Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple comparison tests if applicable (95% confidence).

16S library preparation and sequencing

After 28 days of the experimental feeding period,

shrimp intestines carefully removed using sterile scissors and dissection forceps, were washed with sterile nuclease-free water. Each intestine was placed in absolute ethanol and stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. The quality of DNA extracted from intestine tissue as described by Peña-Rodríguez *et al.* (2020), was determined by electrophoresis in 1.2 % agarose gels, and quantified with a Qubit® 3.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific). The PCR amplification was performed targeting the V3-V4 region of the bacterial 16S rRNA gene using primers V3 (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3') and V4 (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Klindworth *et al.*, 2013). PCR was carried out as follows: initial denaturation step at $95 \text{ }^\circ\text{C}$ (5 min), followed by 35 cycles of denaturation at $95 \text{ }^\circ\text{C}$ (30 s), annealing at $55 \text{ }^\circ\text{C}$ (30 s), and elongation at $72 \text{ }^\circ\text{C}$ (1 min), followed by a final extension step at $72 \text{ }^\circ\text{C}$ (5 min). The amplicon size (550 bp) was verified by electrophoresis in 1 % agarose gels, and purified using AMPure XP (A63881, Beckman Coulter, California, US). The second PCR reaction was performed using Nextera index kit v2 (FC-121-1011, Illumina). Amplification was performed as follows: initial denaturation step at $95 \text{ }^\circ\text{C}$ (3 min), eight cycles of denaturation at $95 \text{ }^\circ\text{C}$ (30 s), annealing at $55 \text{ }^\circ\text{C}$ (30 s), and elongation at $72 \text{ }^\circ\text{C}$ (30 s), and a final extension at $72 \text{ }^\circ\text{C}$ (5 min). The final PCR product was purified using AMPure XP. Library normalization of the 12 libraries (4 per treatment) was performed as described by Peña-Rodríguez *et al.* (2020). Libraries were sequenced on a MiSeq sequencing system (CIBNOR, La Paz, B.C.S., Mexico) using the Nano v2 flow cell of 300 cycles (MS-103-1001, Illumina).

Bioinformatic analyses

The raw reads were quality-trimmed using the Galaxy version 20.09 (The Institute for CyberScience at Penn State, and Johns Hopkins University) (<http://usegalaxy.org>) and aligned using the SILVA v138 database (Yilmaz *et al.* 2014). The sequences were randomly subsampled to normalize the number of sequences and assigned to operational taxonomic units (OTUs) based on 97% similarity. The structural diversity of the microbial communities was calculated with three indices, including Chao, Shannon, and Simpson, calculated by a binary matrix using PAST software (Hammer *et al.*, 2001) (<http://palaeo-electronica.org>).

RESULTS

After 28 days of the feeding trial, all treatments resulted in at least 1.0 g weight gain per week, nevertheless shrimp fed Syn diet resulted in significantly higher growth rate, and SGR compared to shrimp under Ctrl and Pre feeding treatments ($P < 0.05$). The Syn diet showed a significant improvement in feed utilization in terms of FCR and PER compared to the Ctrl diet ($P < 0.05$), but it was not significantly different from Pre and Pro treatments. Survival of shrimp was $\geq 93 \%$ for all treatments ($P > 0.05$) (Table 2).

Each library had 36,278–59,857 raw reads, and after quality control, 33,199–53,250 reads remained per library

Table 2. Growth, feed efficiency and survival of *Litopenaeus vannamei* shrimps fed experimental diets after 4-weeks.**Tabla 2.** Crecimiento, eficiencia de utilización de alimento y supervivencia de *Litopenaeus vannamei* después de 4 semanas de alimentación con las dietas experimentales.

	Diets			
	Ctrl	Pre	Pro	Syn
Growth rate (%)	381±4 ^a	378±11 ^a	390±12 ^{ab}	403±3 ^b
SGR (% day ⁻¹)	5.61±0.03 ^a	5.58±0.08 ^a	5.68±0.09 ^{ab}	5.77±0.02 ^b
FCR	1.56±0.03 ^b	1.50±0.05 ^{ab}	1.47±0.02 ^{ab}	1.45±0.03 ^a
PER	1.84±0.03 ^a	1.94±0.07 ^{ab}	1.97±0.02 ^{ab}	2.01±0.04 ^b
Survival (%)	97±6	93±6	93±6	97±6

Values are given as mean ± SD of triplicate determinations. Values in the same row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). Growth rate = (final wt - initial wt) ÷ initial wt × 100.

SGR: Specific growth rate = 100 (ln avg final wt - ln avg initial wt) / d.

FCR: Feed conversion ratio = dry weight of pelleted feed consumed (g) ÷ wet wt gain (g).

PER: Protein efficiency ratio = wt gain/feed protein intake.

Survival = final number of shrimp/initial number shrimp × 100.

with a total of 538,446 reads ($n = 12$). One library of the prebiotic treatment was identified as an outgroup replicate according to a principal component analysis, and was eliminated from subsequent analyses. The analyses clustered the sequences into 9,247 OTUs. At phylum level, shrimps fed with the four treatments (Figure 1) revealed that the most dominant bacterial phylum of the shrimp intestine was *Proteobacteria* with 80 % in Ctrl diet, 82 % in Pre and Pro diets, and the highest percentage was in Syn diet with 84 %. Within *Proteobacteria* phylum, control diet showed the highest relative proportion (42 %) in *Gammaproteobacteria* class compared to the rest of treatments, in which Pro diet presented a significant reduction of this bacteria group (23 %). In contrast, *Alphaproteobacteria* in control diet resulted in the lowest relative proportion (34 %) respect to the other diets (41-53 %). The second dominant bacterial phylum was *Bacteroidetes*, with the highest proportion in control diet (16 %), and the rest of the treatments resulted in the range of 11 to 13 %. The third dominant phylum was *Actinobacteria* with 2-3 % among treatments. *Firmicutes* phylum includes the probiotics used, where the highest proportion was present in the prebiotic-treatment group with 2 %, whereas the rest of treatments showed 0.6 %.

At Order taxa level (Figure 2), *Rhodobacterales* was the most abundant bacteria in shrimp among treatments, and mostly represented by *Rhodobacteraceae* bacterial family (> 97 %). Shrimps fed with Pro diet probiotic showed the highest proportion of *Rhodobacteraceae* (53 %), followed by prebiotic and symbiotic treatments (41 and 40 %, respectively), and the lowest abundance was found in the control diet (34 %). The most abundant genus present in *Rhodobacteraceae* among treatments was *Octadecabacter* with 11 % of abundance for control, 12 % for prebiotic, 14 % for symbiotic, and 19 % for probiotic treatment.

The second most abundant bacteria order among treatments was *Vibrionales* (Figure 2), mainly from *Vibriona-*

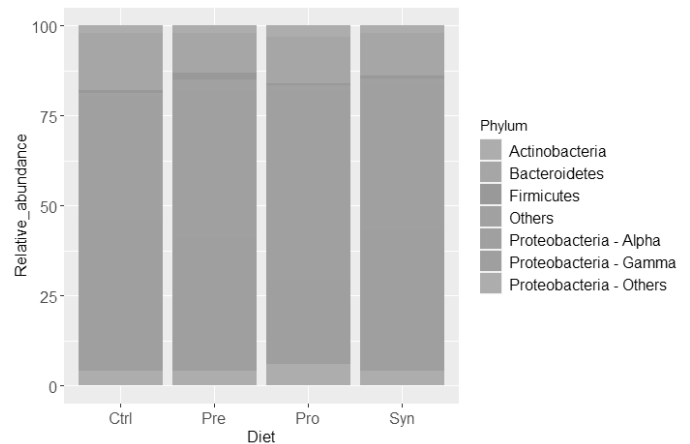
**Figure 1.** Relative abundance (%) of bacterial, at phylum level (*Proteobacteria* divided at class taxa level), in shrimps fed during 4-weeks with the control (Ctrl), prebiotic (Pre), probiotic (Pro), and symbiotic (Syn) diets.

Figura 1. Abundancia relativa (%) de bacterias a nivel de filo (*Proteobacteria* dividido a nivel de clase) en camarones alimentados durante 4 semanas con las dietas control (Ctrl), prebiótica (Pre), probiótica (Pro) y simbiótica (Syn).

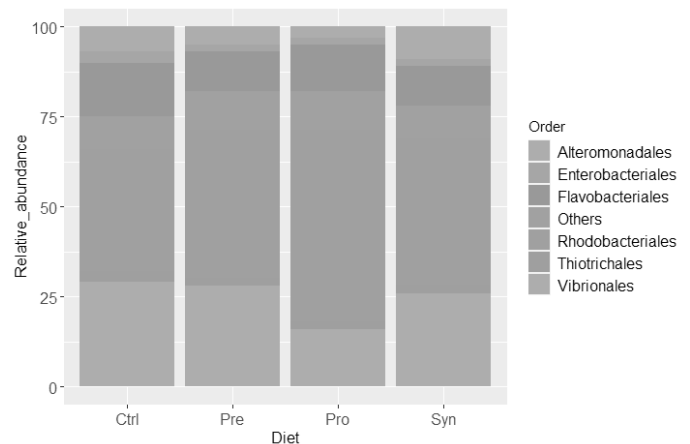
**Figure 2.** Relative abundance (%) of bacteria, at order level, in shrimps fed during 4-weeks with the control (Ctrl), prebiotic (Pre), probiotic (Pro), and symbiotic (Syn) diets.

Figura 2. Abundancia relativa (%) de bacterias a nivel de orden en camarones alimentados durante 4 semanas con las dietas control (Ctrl), prebiótica (Pre), probiótica (Pro) y simbiótica (Syn).

ceae family. In this regard, the Pro treatment presented the lowest proportion among treatments with 16 %, followed by the symbiotic with 26 %, and prebiotic and control with 28 and 29 %, respectively; in all cases, this family was represented entirely by the *Vibrio* genus. In the case of *Flavobacteriales* order level, represented by the *Flavobacteriaceae* family, control treatment showed 15 % relative abundance in contrast to 13 % in Pro, and 11 % in Pre and Syn treatments.

In the case of probiotic bacteria related to diets, at class taxonomic level, *Bacilli* bacteria were more abundant in prebiotic treatment (2 %) than in probiotic, symbiotic (0.5 % each), and control (0.4 %). In terms of genus abundance, *Lactobacillus* was absent in shrimp fed with control treatment, whereas those fed with prebiotic represented 0.02 % of total bacteria, and < 0.01 % in probiotic and symbiotic treatments. In the case of *Bacillus*, probiotic and symbiotic treatments

showed 0.05 and 0.04 % abundance, prebiotic 0.03 %, and control 0.01 %. Among different treatments, 20 species were identified including five species of *Vibrionaceae*; *Vibrio furnissii* was the most abundant for control treatment (3 %); whereas *Vibrio antiquarius* was the dominant species present for the rest of treatments (3-4 %).

According to the Chao index, bacterial richness estimator index values among treatments ranged from 1,567 to 2,123, where Pro and Syn treatments, both with probiotics in the feed, resulted with higher values than those presented in Ctrl and Pre dietary treatments (Table 3). In terms of diversity assessed by the Shannon index among treatments, values ranged from 3.03 to 3.57. Simpson index values ranged from 0.14 to 0.23, where Pre and Syn treatments showed higher diversity among treatments.

Table 3. Number of OTUs, richness estimation (Chao1), and diversity estimation (Shannon and Simpson) of intestinal community bacteria, of shrimp fed experimental diets after 4-weeks.

Tabla 3. Numero de OTUs, estimación de riqueza (Chao1), y estimación de diversidad (Shannon y Simpson) de las comunidades bacterianas del intestino del camarón, alimentado con las dietas experimentales durante 4 semanas

	Diets			
	Ctrl	Pre	Pro	Syn
OTUs	340±80	496±12	687±115	650±30
Richness estimator				
Chao1	1,567±0.57	1,719±0.57	1,938±0.57	2,123±1.15
Diversity estimators				
Shannon	3.03±0.14	3.52±0.07	3.30±0.40	3.57±0.12
Simpson	0.17±0.12	0.20±0.03	0.19±0.08	0.23±0.09

DISCUSSION

The importance of gastrointestinal microbiota on host health and growth has been documented. The objective of probiotics and prebiotics in the feed is to induce favorable intestinal bacteria to promote growth, improve pathogen resistance and the immune response. The inclusion of 0.2-0.8% inulin has proved to enhance shrimp growth (Li *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020), however, in the present work no difference on shrimp growth was evident, when included without probiotic, compared to Ctrl diet as reported by other authors with inulin inclusion levels between 0 and 1% (Luna-González *et al.*, 2012; Partida-Arangure *et al.*, 2013). This discrepancy may be associated to microorganism community present in the culture system. The use of inulin has been proven to be a good source of nutrients to promote probiotic bacteria from *Lactobacillus* and *Bacillus* genus (Savedboworn *et al.*, 2018; Zherebtsov *et al.*, 2002), providing a wide range of exoenzymes, including inulinase, that allow using inulin as source of carbon (Saha, 2006; Zherebtsov *et al.*, 2002). *Bacillus* sp. and *Lactobacillus* sp. included in feed may also enhance

shrimp protease, lipase, amylase, and cellulase activities, which suggests a better use of the nutrients contained in the feed and reflected in improvement of growth and feed efficiency utilization (Kongnum and Hongpattarakere, 2012; Zheng *et al.*, 2017).

In the present study, the final weight of shrimps fed Pro treatment was higher than shrimps fed the control diet (Ctrl), but not significantly different ($P > 0.05$). Wang *et al.* (2019) described that the inclusion of *Lactobacillus pentosus* or *Bacillus subtilis* at $\sim 1 \times 10^6$ CFU g⁻¹ in feed, improved weight gain in white shrimp. Similar effect was shown when the inclusion of probiotic *Bacillus* (*B. subtilis* and *B. licheniformis*) in the diet at 1×10^4 and 1×10^8 CFU g⁻¹ significantly improved growth performance and feed utilization efficiency in *L. vannamei* (Sadat Hoseini Madani *et al.*, 2018). In the case of the synbiotic treatment (Syn), shrimp growth and feed utilization efficiency improved in contrast to the Ctrl diet. Similar results were shown by Huynh *et al.* (2018), when shrimp fed with a synbiotic diet composed of *Lactobacillus plantarum* and galactooligosaccharide improved shrimp weight gain; nevertheless, the use of the probiotic alone showed no significant differences compared to the control diet, highlighting the importance of the presence of the prebiotic in the diet. The synergism between prebiotics and probiotics to improve shrimp growth (Boonanuntanasarn *et al.*, 2016; Munaeni *et al.*, 2014) has been suggested by the indirect and direct release of extracellular bacterial digestive enzymes and bioactive compounds that, in conjunction with the activation of the digestive enzymes of the host, improve the efficiency of feed utilization (Huynh *et al.*, 2017).

After sequencing analysis, between 35 and 40 % of the reads were classified within a genus or species. The use of the probiotic in the feed (Pro and Syn treatments) increased the shrimp intestinal bacterial richness according to the Chao index. Inclusion of prebiotic (Pre and Syn) in the feed promoted higher bacterial diversity according to both Shannon and Simpson indices. The increase of species richness in intestinal microbiota in *L. vannamei* has been also reported with the use of synbiotic composed of galactooligosaccharide and *L. plantarum* (Huynh *et al.*, 2019), *Bacillus* sp. probiotic, honey prebiotic or a mix of them (synbiotic) (Hasyimi *et al.*, 2020), suggesting that synbiotics in feed may modulate intestinal bacterial community.

The dominant bacterial group in shrimps fed the four treatments was the phylum *Proteobacteria*, which has been reported to be highly abundant in both healthy or diseased shrimp (Dai *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2017), and also in shrimp fed probiotics and synbiotics included in the diet (Hasyimi *et al.*, 2020). Differences in the *Proteobacteria* abundance due to the diet effect may also relate to shrimp size as observed by Dai *et al.* (2018), who found a temporal variation in shrimp gut microbiota composition (between 8 to 9 g). Microbiome changes also occur between culture stages, as observed in *L. vannamei* larvae, being *Proteobacteria* the most abundant phylum (Zheng *et al.*, 2017). Some bacteria from the *Proteobacteria* phylum serve as a direct source of nutrients (Moss,

2002), and could improve feed digestion due to their digestive enzymes that may enhance nutrient utilization in shrimp (Wainwright and Mann, 1982). A diverse microbial community has been suggested to improve the degradation of low or indigestible substrates, which may increase the efficiency of feed utilization (Cottrell and Kirchman, 2003).

Shrimps fed the four treatments presented a high abundance of *Bacteroidetes* (8-19 %) and *Actinobacteria* (2-3 %), the last reported as abundant in healthy shrimps (5.6 %), compared to diseased shrimps (0.1 %) (Dai *et al.*, 2018). *Proteobacteria*, *Bacteroides*, *Actinobacteria*, and *Firmicutes* were found in all treatments, and are considered natural microbiota in the penaeid shrimp gut (Rungrassamee *et al.*, 2014; Tzuc *et al.*, 2014).

At family taxonomic level, a similar abundance of *Flavobacteriaceae* was found among treatments, which has been described as abundant in healthy farmed shrimp (Xiong *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2017). Likewise, some specialized bacteria belonging to this family can degrade complex compounds including structural polysaccharides such as chitin from shrimp exoskeleton (Kirchman, 2002; Williams *et al.*, 2013), implying a beneficial effect on pond water quality.

The nutrition strategy, including diets with prebiotics, probiotics, and synbiotics, represents an alternative to the use of antibiotics to control pathogenic bacteria including some *Vibrio* species (Johnson, 2013; Kewcharoen and Srisapoom, 2019). According to our results, shrimps fed with probiotics decreased the abundance of *Vibrio* sp. compared to the control treatment, as reported in the freshwater prawn *Macrobrachium rosebergi* fed with the inclusion of the probiotic *Lactobacillus* that showed an inhibitory effect on the gram-negative bacteria in the intestine (Venkat *et al.*, 2004). Moreover, a previous study with the inclusion in feed of *B. subtilis* at 10^5 CFU g⁻¹, produced antimicrobial activity against pathogenic *Vibrio* species, with a reduction on shrimp mortality (Balcázar and Rojas-Luna, 2007). In the same way, the inoculation of 10^6 CFU ml⁻¹ of *Lactobacillus* sp. in water reduced the prevalence of pathogenic *Vibrio* in brine shrimp culture (Quiroz-Guzmán *et al.*, 2018). The *Vibrionaceae* reduction in shrimps fed the probiotic diet (Pro) resulted in an increase of *Rhodobacteraceae* family, which has been reported at higher abundance in healthy shrimp as compared to diseased shrimps (Dai *et al.*, 2018).

In the case of the Syn treatment, a reduction in *Vibrio* sp. abundance compared to the control treatment was observed. This result agrees with that observed in the same species, when *L. plantarum* and galactooligosaccharide synbiotic was included in the diet (Huynh *et al.*, 2019), as well as for *Penaeus japonicus* (Zhang *et al.*, 2011) fed a *Bacillus* sp. and isomaltooligosaccharides supplemented diet. The use of a mix of *B. subtilis* with β -glucan as prebiotic included in feed, also reduced the prevalence of *Vibrio* sp. in shrimp intestine, in contrast to β -glucan alone (Boonanuntanasarn *et al.*, 2016). The reduction of *Vibrio* abundance by the use of synbiotics in the diet (oligosaccharides from sweet potato and *Bacillus* sp. NP5) has been related to an increase of total

bacterial count in *L. vannamei* (Munaeni *et al.*, 2014). Nevertheless, in the present work, *Vibrio* in the prebiotic treatment was similar to the control treatment. *Vibrionaceae* abundance may be affected by the source of the prebiotic employed; in the case of β -glucan, it has been reported that *Vibrio* abundance in shrimp gut is not affected when included alone in feed (Boonanuntanasarn *et al.*, 2016). In turn, some *Vibrio* species may efficiently use inulin as a source of carbon to proliferate, as reported by Mahious *et al.* (2006) in turbot larvae. In this regard, the potential benefits of including inulin to the shrimp diet seems to be closely related to the natural microbial community and the introduced microorganism (probiotics) in the culture system.

CONCLUSIONS

In conclusion, we found that the synbiotic included in the diet improved shrimp growth, and the probiotic employed (*B. subtilis* and *Lactobacillus* sp.) reduced the relative abundance of *Vibrio* sp. in the shrimps' intestine; nevertheless, when combined with a prebiotic (inulin), this effect was reduced.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Mexico) through Grant No. 2015-01-887. We are thankful to Samuel Echeverría and Omar Camorlinga from Larvas Gran Mar, SA de CV, for kindly donate the shrimp juveniles, and Sandra de la Paz-Reyes from the Laboratory of Aquaculture Nutrition at CIBNOR for all the facilities and technical support during the experiments.

REFERENCES

- Alagappan, K.M., Deivasigamani, B., Somasundaram, S.T., Kumaran, S. 2010. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and its specific phages from shrimp ponds in east coast of India. *Current microbiology*, 61, 235-240.
- AOAC. 2005. Official methods of analysis of the association of analytical chemists international, 18th ed. Gathersburg, MD, U.S.A.
- Balcázar, J.L., Rojas-Luna, T. 2007. Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Current Microbiology*, 55, 409-412.
- Boonanuntanasarn S., Wongsasak, U., Pitaksong, T., Chaijamrus, S. 2016. Effects of dietary supplementation with β -glucan and synbiotics on growth, haemolymph chemistry, and intestinal microbiota and morphology in the Pacific white shrimp. *Aquaculture Nutrition*, 22, 837-845.
- Cottrell, M., Kirchman, D. 2003. Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. *Limnology and Oceanography*, 48, 168-178.
- Dai, W., Yu, W., Xuan, L., Tao, Z., Xiong, J. 2018. Integrating molecular and ecological approaches to identify potential polymicrobial pathogens over a shrimp disease progression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 3755-3764.
- Ebeling, M.E. 1968. The Dumas method for nitrogen in feeds. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 51, 766-770.

- Elizondo-González, R., Quiroz-Guzmán, E., Escobedo-Fregoso, C., Magallón-Servín, P., & Peña-Rodríguez, A. (2018). Use of seaweed *Ulva lactuca* for water bioremediation and as feed additive for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *PeerJ*, 6, e4459.
- García-Rodríguez, R. 2003. Relevancia de las bacterias ácido lácticas en los diferentes estadios del cultivo del camarón. Bachelor dissertation. UABCS University, La Paz, B.C.S., México.
- Hai, N.V. 2015. The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, 119, 917-935.
- Hammer, Ø., Harper, D.A., Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 9.
- Hasyimi, W., Widanarni, W., Yuhana, M. 2020. Growth Performance and Intestinal Microbiota Diversity in Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Fed with a Probiotic Bacterium, Honey Prebiotic, and Synbiotic. *Current Microbiology*, 77, 2982-2990.
- Huynh, T.G., Shiu, Y.L., Nguyen, T.P., Truong, Q.P., Chen, J.C., Liu, C.H. 2017. Current applications, selection, and possible mechanisms of actions of synbiotics in improving the growth and health status in aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, 64, 367-382.
- Huynh, T.G., Chi, C.C., Nguyen, T.P., Tran, T.T.H., Cheng, A.C., Liu, C.H. 2018. Effects of synbiotic containing *Lactobacillus plantarum* 7-40 and galactooligosaccharide on the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 49, 2416-2428.
- Huynh, T.G., Hu, S.Y., Chiu, C.S., Truong, Q.P., Liu, C.H. 2019. Bacterial population in intestines of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* fed a synbiotic containing *Lactobacillus plantarum* and galactooligosaccharide. *Aquaculture Research*, 50, 807-817.
- Jamal, M.T., Abdulrahman, I.A., Al Harbi, M., Chithambaran, S. 2019. Probiotics as alternative control measures in shrimp aquaculture: A review. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 7, 69-77.
- Johnson, C.N. 2013. Fitness factors in Vibrios: A Mini-review. *Microbial Ecology*, 65, 826-851.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41:e1.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J., Gibson, L. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274, 1-14.
- Kewcharoen, W., Srisapoome, P. 2019. Probiotic effects of *Bacillus spp.* from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains). *Fish & shellfish immunology*, 94, 175-189.
- Kirchman, D.L. 2002. The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 39, 91-100.
- Kongnum, K., Hongpattarakere, T. 2012. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish and Shellfish Immunology*, 32, 170-177.
- Kumar, V., Roy, S., Meena, D.K., Sarkar, U.K. 2016. Application of probiotics in shrimp aquaculture: importance, mechanisms of action, and methods of administration. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 24, 342-368.
- Li, Y., Yuan, W., Zhang, Y., Liu, H., Dai, X. 2020. Single or combined effects of dietary arabinoxylan-oligosaccharide and inulin on growth performance, gut microbiota, and immune response in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Oceanology and Limnology*, 1-14.
- Li, P., Burr, G.S., Gatlin, D.M., Hume, M.E., Patnaik, S., Castille, F.L., Lawrence, A.L. 2007. Dietary supplementation of short-chain fructooligosaccharides influences gastrointestinal microbiota composition and immunity characteristics of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in a recirculating system. *The Journal of Nutrition*, 137, 2763-2768.
- Liu, C.H., Chiu, C.S., Ho, P.L., Wang, S.W. 2009. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1031-1041.
- Liu, K.F., Chiu, C.H., Shiu, Y.L., Cheng, W., Liu, C.H. 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish and Shellfish Immunology*, 28, 837-844.
- Luna-González, A., Almaraz-Salas, J.C., Fierro-Coronado, J.A., Flores-Miranda, M.C., González-Ocampo, H.A., Peraza-Gómez, V. 2012. The prebiotic inulin increases the phenoloxidase activity and reduces the prevalence of WSSV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. *Aquaculture*, 362-363, 28-32.
- Mahious, A.S., Gatesoupe, F.J., Hervi, M., Metailler, R., Ollevier, F. 2006. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). *Aquaculture International*, 14, 219-229.
- Manning, T.S., Gibson, G.R. 2004. Probiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18, 287-298.
- Martínez-Córdova, L.R., Emerenciano, M., Miranda-Baeza, A., Martínez-Porchas, M. 2015. Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: an updated review. *Reviews in Aquaculture*, 7, 131-148.
- Martinez, J.L. 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, 157, 2893-2902.
- Moss, S.M. 2002. Dietary importance of microbes and detritus in Penaeid shrimp aquaculture. In: Lee, C.S., O'Bryen, P. (Eds.), *Microbial approaches to aquatic nutrition within environmentally sound aquaculture production systems*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 1-18 pp.
- Munaeni, W., Yuhana, M., Widanarni, W. 2014. Effect of micro-encapsulated synbiotic at different frequencies for luminous Vibriosis control in White shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Microbiology Indonesia*, 8, 73-80.
- Ninawe, A.S., Selvin, J. 2009. Probiotics in shrimp aquaculture: Avenues and challenges. *Critical Reviews in Microbiology*, 35, 43-66.
- Novriadi, R. 2016. Vibriosis in aquaculture. *Omni-Akuatika*, 12(1).
- Olmos, J., Acosta, M., Mendoza, G., Pitones, V. 2020. *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution. *Archives of microbiology*, 202, 427-435.
- Partida-Arangure, B.O., Luna-González, A., Fierro-Coronado, J.A., Flores-Miranda, C., González-Ocampo, H.A. 2013. Effect of inulin and probiotic bacteria on growth, survival, immune response, and prevalence of white spot syndrome virus

- (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* cultured under laboratory conditions. African Journal of Biotechnology, 12, 3366-3375.
- Peña-Rodríguez, A., Morales-Alvarado, G., Elizondo-González, R., Mendoza-Carrión, G., Tovar-Ramírez, D., Escobedo-Fregoso, C. 2020. Seaweed single cell detritus effects on the digestive enzymes activity and microbiota of the oyster *Crassostrea gigas*. Journal of Applied Phycology, 32, 3481-3493.
- Quiroz-Guzmán, E., Vázquez-Juárez, R., Luna-González, A., Balcázar, J.L., Barajas-Sandoval, D.R., Martínez-Díaz, S.F. 2018. Administration of probiotics improves the brine shrimp production and prevents detrimental effects of pathogenic *Vibrio* species. Marine Biotechnology, 20, 512-519.
- Rashid, M., Stingl, U. 2015. Contemporary molecular tools in microbial ecology and their application to advancing biotechnology. Biotechnology Advances, 33, 1755-1773.
- Ringø, E., Olsen, R.E., Gifstad, T., Dalmo, R.A., Amlund, H., Hemre, G.I., Bakke, A.M. 2010. Prebiotics in aquaculture: A review. Aquaculture Nutrition, 16, 117-136.
- Runggrasamee, W., Klanchui, A., Maibunkaew, S., Chaipayechara, S., Jiravanichpaisal, P., Karoonuthaisiri, N. 2014. Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). PLoS ONE, 9, e91853.
- Sadat Hoseini Madani, N., Adorian, T.J., Ghafari Farsani, H., Hoseinifar, S.H. 2018. The effects of dietary probiotic *Bacilli* (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) on growth performance, feed efficiency, body composition and immune parameters of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. Aquaculture Research, 49(5), 1926-1933.
- Saha, B.C. 2006. Production of mannitol from inulin by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. Enzyme and Microbial Technology, 39, 991-995.
- Savedboworn, W., Niyomrat, S., Naknovn, J., Phattayakorn, K. 2018. Impact of inulin on viability and storage stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 in fermented rice extract. Agriculture and Natural Resources, 51, 463-469.
- Thompson, F.L., Iida, T., Swings, J. 2004. Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 403-431.
- Tzuc, J., Escalante, D., Rojas-Herrera, R., Gaxiola-Cortés, G., Ortiz, M. 2014. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). SpringerPlus, 3, 280.
- Vargas-Albores, F., Porchas-Cornejo, M.A., Martínez-Porchas, M., Villalpando-Canchola, E., Gollas-Galván, T., Martínez-Córdova, L.R. 2017. Bacterial biota of shrimp intestine is significantly modified by the use of a probiotic mixture: a high throughput sequencing approach. Helgoland Marine Research, 71, 5.
- Venkat, H.K., Sahu, N.P., Jain, K.K. 2004. Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquaculture Research, 35, 501-507.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 655-671.
- Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Pruesse E, Quast C, Schweer T, Peplies J, Ludwig W, Glöckner FO (2014) The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, 42:D643-D648.
- Wainwright, P.F., Mann, K.H. 1982. Effect of antimicrobial substances on the ability of the mysid shrimp *Mysis stenolepis* to digest cellulose. Marine Ecology Progress Series, 7, 309-313.
- Wang, Y.C., Hu, S.Y., Chiu, C.S., Liu, C.H. 2019. Multiple-strain probiotics appear to be more effective in improving the growth performance and health status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, than single probiotic strains. Fish & shellfish immunology, 84, 1050-1058.
- Williams, T.J., Wilkins, D., Long, E., Evans, F., Demaere, M.Z., Raftery, M.J., Cavicchioli, R. 2013. The role of planktonic Flavobacteria in processing algal organic matter in coastal East Antarctica revealed using metagenomics and metaproteomics. Environmental Microbiology, 15, 1302-1317.
- Wongsasak, U., Chaijamrus, S., Kumkhong, S., Boonanuntanasarn, S. 2015. Effects of dietary supplementation with β -glucan and synbiotics on immune gene expression and immune parameters under ammonia stress in Pacific white shrimp. Aquaculture, 436, 179-187.
- Xiong, J., Wang, K., Wu, J., Qiuqian, L., Yang, K., Qian, Y., Zhang, D. 2015. Changes in intestinal bacterial communities are closely associated with shrimp disease severity. Applied Microbiology and Biotechnology, 99, 6911-6919.
- Zhang, Q., Tan, B., Mai, K., Zhang, W., Ma, H., Ai, Q., Wang, X., Liufu, Z. 2011. Dietary administration of *Bacillus* (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (Decapoda: Penaeidae). Aquaculture Research, 42, 943-952.
- Zheng, C.N., Wang, W. 2017. Effects of *Lactobacillus pentosus* on the growth performance, digestive enzyme and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Aquaculture Research, 48(6), 2767-2777.
- Zheng, X., Duan, Y., Dong, H., Zhang, J. 2017. Composition, diversity and function of intestinal microbiota in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at different culture stages. PeerJ, 5, e3986.
- Zherebtsov, N.A., Shelamova, S.A., Abramova, I.N. 2002. Biosynthesis of inulinases by *Bacillus* bacteria. Applied Biochemistry and Microbiology, 38, 544-548.
- Zhou, L., Li, H., Qin, J.G., Wang, X., Chen, L., Xu, C., Li, E. 2020. Dietary prebiotic inulin benefits on growth performance, antioxidant capacity, immune response and intestinal microbiota in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at low salinity. Aquaculture, 518, 734847.
- Zhou, J., Fang, W., Yang, X., Zhou, S., Hu, L., Li, X., Qi, X., Su, H., Xie, L. 2012. A nonluminescent and highly virulent *Vibrio harveyi* strain is associated with "bacterial white tail disease" of *Litopenaeus vannamei* shrimp. PLoS ONE, 7, e29961.
- Zhou, X.X., Wang, Y.B., Li, W.F. 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. Aquaculture, 287, 349-353.
- Zubaidah, A., Yuhana, M., Widanarni. 2015. Encapsulated synbiotic dietary supplementation at different dosages to prevent vibriosis in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. HAYATI Journal of Biosciences, 22, 163-168.



Dose-dependent effect of recombinant CHH-B1 on osmoregulatory capacity and Na⁺/K⁺-ATPase expression in bilaterally eyestalk-ablated shrimp *Litopenaeus vannamei*

Efecto dosis-dependiente de la CHH-B1 recombinante sobre la capacidad osmorreguladora y la expresión de la Na⁺/K⁺-ATPasa en camarones *Litopenaeus vannamei* sometidos a ablacion bilateral del pedúnculo ocular

Laura Camacho-Jiménez, Fernando Díaz, Edna Sánchez-Castrejón, Ariana Montiel-Arzate, Elizabeth Ponce-Rivas*

Departamento de Biotecnología Marina, Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE), 22860 Ensenada, México

ABSTRACT

Osmoregulation in crustaceans is under neuroendocrine control by the crustacean hyperglycemic hormones (CHHs), which modify water and ion concentrations in diverse species. Previous studies suggested that CHH variant B1 (CHH-B1) has effects on the osmoregulatory responses of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. For a better understanding of the molecular action mechanisms of CHH-B1 in osmoregulation, in this work, a biological assay was done by injecting different dosages (5, 10, 50, 100, 250, 500, and 1000 pmol) of recombinant CHH-B1 (rCHH-B1) into bilaterally eyestalk-ablated shrimp under hyper-osmotic conditions. The gene expression of Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) was quantified by RT-qPCR in gills of shrimp injected with rCHH-B1. In addition, osmoregulatory capacity (OC) of shrimp was estimated as the difference between the osmotic pressure (OP) of the external medium and that of hemolymph. The results indicate that CHH-B1 regulates the OC of shrimp during hypo-regulation by modulating Na⁺/K⁺-ATPase at transcriptional level in a dose-dependent way. Our results suggest that CHH has direct participation in the control of osmo-ionic regulation mechanisms, not only in *L. vannamei* but in crustaceans in general.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, shrimp, crustacean hyperglycemic hormone, osmoregulatory capacity, Na⁺/K⁺-ATPase

RESUMEN

La osmorregulación en crustáceos está bajo control neuroendócrino por las hormonas hiperglucémicas de crustáceos (CHHs), las cuales han mostrado modificar las concentraciones de agua e iones en diversas especies. Estudios previos sugieren que la CHH variante B1 (CHH-B1) tiene efectos en las respuestas osmorreguladoras del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Para una mejor comprensión sobre los mecanismos de acción moleculares de CHH-B1 en osmorregulación, en este trabajo, se realizó un ensayo biológico inyectando diferentes dosis (5, 10, 50, 100, 250, 500 y 1000 pmol) de CHH-B1 recombinante (rCHH-B1) a camarones bilateralmente ablacionados del pedúnculo ocular bajo condiciones hiper-osmóticas. La expresión génica de la Na⁺/K⁺-ATPasa se cuantificó por RT-qPCR en branquias de

camarones inyectados con rCHH-B1. Además, se estimó la capacidad osmorreguladora (CO) de los camarones como la diferencia entre la presión osmótica (PO) del medio externo y la de la hemolinfa. Los resultados indican que CHH-B1 regula la CO de camarones durante la hypo-regulación mediante la modulación de la NKA a nivel transcripcional de manera dosis-dependiente. Nuestros resultados sugieren que CHH tiene una participación directa en el control de los mecanismos de regulación osmo-iónica, no solo en *L. vannamei* sino en crustáceos en general.

Palabras claves: *Litopenaeus vannamei*, camarón, hormona hiperglucémica de crustáceos, capacidad osmorreguladora, Na⁺/K⁺-ATPasa

INTRODUCTION

The white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) is a commercial penaeid species with a distribution range throughout the Pacific coast of Sonora, Mexico, and the north of Peru (Holthius, 1980), which tolerates a wide range of environmental salinities (~1-40 ppt). At salinities under iso-osmotic point (~26 ppt), penaeid shrimp hyper-regulate solute concentrations in hemolymph, whereas at high salinities they behave as hypo-regulators (Díaz *et al.*, 2001; Chong-Robles *et al.*, 2014).

Osmoregulation in crustaceans involves the adjustment of the osmotic pressure (OP) of the intra- and extracellular fluids (e.g., hemolymph) (Péqueux 1995; Charmantier *et al.*, 2009). In euryhaline species, such as *L. vannamei*, the extracellular regulation comprises changes in active ion transport, urine production, and permeability of the body surface to water and salts (Henry *et al.*, 2012). The osmoregulation is subjected to a neuroendocrine control. The X-organ/sinus gland complex (XO/SG) located in eyestalks appears essential for the regulation of osmoregulatory mechanisms (Kamemoto, 1976; Charmantier *et al.*, 1984; Mantel, 1985). The crustacean hyperglycemic hormones (CHHs) are the most abundant neuropeptides produced in the XO/SG complex (Webster *et al.*, 2012). Classic gland ablation experiments in lobsters and crayfish have shown that eyestalk removal alters water and ion concentrations in crustaceans, an effect that can be restored by the injection of CHHs purified from SG tissue (Charmantier-Daures *et al.*, 1994; Serrano *et al.*, 2003).

Moreover, chromatographic fractions containing CHH raised Na^+ influx in isolated gills from crabs (Spanings-Pierrot, 2000). This evidence suggests that CHHs may have a prime role in controlling the osmoregulatory processes in decapod crustaceans.

In *L. vannamei*, the cDNAs encoding different CHH variants isolated from the eyestalks were cloned and sequenced (Lago-Lestón *et al.*, 2007; Ventura-López *et al.*, 2016). The variants named CHH-B1 and CHH-B2 are originated from the same gene through alternative splicing events (Lago-Lestón *et al.*, 2007). Notably, the expression of CHH variant B1 (CHH-B1) is strongly influenced by environmental salinity and temperature (Lago-Lestón *et al.*, 2007). Moreover, the ability of CHH-B1 peptide to elicit hyperglycemia and hyperlipidemia in shrimp hemolymph has been proven by the injection of recombinant peptides (Sánchez-Castrejón *et al.*, 2008; Camacho-Jiménez *et al.*, 2015; Montiel-Arzate *et al.*, 2020). Administration of recombinant CHH-B1 also has demonstrated to restore the osmoregulatory capacity (OC) of *L. vannamei* acclimated to hyper-osmotic salinity (Camacho-Jiménez *et al.*, 2017a), suggesting that this variant participates in the response to salinity stress and the hydromineral balance in white shrimp.

The Na^+/K^+ -ATPase (NKA) pump is a main driving force for ion transport in the cells of aquatic organisms, including crustaceans (Lucu and Towle, 2003). In *L. vannamei*, NKA α -subunit mRNA expression in posterior gills responds to changes in salinity conditions, suggesting its importance for shrimp survival to osmotic stress (Sun *et al.*, 2011). Moreover, we have recently demonstrated that NKA mRNA expression in posterior gills of intact *L. vannamei* shrimp maintained at iso-osmotic salinity (26 ppt) was significantly up-regulated 3 h post-injection of rCHH-B1. However, the acute transference of shrimp from 26 ppt to hypo-osmotic salinity (8 ppt) showed a significant decrease of the NKA expression 1 h post-injection of rCHH-B1. In contrast, the NKA transcripts were significantly up-regulated 1 h post-injection of rCHH-B1 in animals acutely exposed to hyper-osmotic conditions (45 ppt). These results suggested that CHH-B1 could be directly involved in regulating ion transport mechanisms (Camacho-Jiménez *et al.*, 2018).

Due to the importance of this molecular mechanism for the osmo-ionic regulation, we examined *in vivo* the dose-dependent effects of rCHH-B1 on the hemolymph OC and its relation with the mRNA expression of the NKA catalytic α -subunit in gills of bilaterally eyestalk-ablated shrimp acclimated to hyper-osmotic salinity.

MATERIAL AND METHODS

Animals

L. vannamei post-larvae (PL) were brought to CICESE's Marine Biotechnology wet laboratory from a shrimp farm located in La Paz, Mexico. The PL were grown to sub-adults in 2000 L reservoirs filled with seawater (35 ± 1 ppt, $28 \pm 1^\circ\text{C}$) under constant aeration. Sub-adult shrimp were individually placed within 3.5 L containers inside 200 L reservoirs with re-

circulated seawater (35 ppt, 26°C) with aeration. Shrimp were fed once a day with commercial pelleted feed, and remanent food and feces were siphoned from the containers. Animals were maintained under these conditions for 10 days until the assays.

Expression and purification of rCHH-B1

Recombinant CHH-B1 (rCHH-B1) was expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and purified by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) as previously reported, with minor modifications (Camacho-Jiménez *et al.*, 2015). Briefly, *P. pastoris* (strain X-33) with the pPicZ α A-CHH-B1a plasmid for CHH-B1 expression integrated into its chromosomes was cultured in YPD medium for 18 h (30°C and 200 rpm). The YPD culture (0.5 mL) was used to inoculate BMGY medium (500 mL), which was maintained until an $\text{OD}_{600} = 4$. The BMGY culture was centrifuged ($2,500 \times g$, 5 min), and cells were in BMMY medium (100 mL) supplemented with 2% methanol as an inducer for recombinant protein expression. The induction was maintained for 24 h (30°C , 200 rpm) with methanol supplementation every 12 h. After induction, culture supernatant was collected by centrifugation ($2,500 \times g$, 5 min). Proteins from the supernatant were precipitated with 50% ammonium sulfate, and the concentrate was dialyzed with phosphate-buffered saline (PBS) 1X. The recombinant protein was separated from other dialyzed proteins by RP-HPLC using a C18 column (TSKgel® Octadecyl-4PW 4.6 mm \times 150 mm, Tosoh, Tokyo, Japan) and a gradient of acetonitrile (0–55%) with 0.1% TFA. The recovery of recombinant protein was confirmed through Western blot immunodetection using an anti-CHH-B1/B2 antibody. Proteins recovered after RP-HPLC were separated by Tricine-SDS-PAGE (12.5%), transferred to a nitrocellulose membrane (0.45 μm) (Bio-Rad, San Diego, CA, USA), and then incubated with the rabbit anti-CHH-B1/B2 polyclonal antibody (1:500) (GenScript, Piscataway, NJ, USA) followed by incubation with a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) (1:5000). Visualization of positive bands was done with the 1-Step TMB Blotting reagent (Pierce, Rockford, IL, USA). The BCA Protein Assay Kit (Pierce) was used to determine the concentration of rCHH-B1. The recombinant protein was stored at -80°C until dose-response experiment.

Biological assay and sample collection

A dose-response *in vivo* assay was done as described by Camacho-Jiménez *et al.* (2015) using bilaterally eyestalk-ablated shrimp. This experiment had the aprovation from CICESE's ethical committee. Fifty-four sub-adult shrimp (12.89 ± 2.41 g) were transferred to individual containers (3.5 L) inside tanks (200 L) filled with seawater (35 ± 1 ppt, $26 \pm 1^\circ\text{C}$) under constant aeration. Daily, animals were fed with shrimp pelleted diet (4% of their wet weight), debris and feces were siphoned from containers, and seawater was totally exchanged. The intermolt stage was calculated as half of the time between two consecutive molting events indicated by

exoskeleton deposition in the containers. During the first counted intermolt, one eyestalk was extirpated from each shrimp by cutting and cauterization, whereas the remaining eyestalk was removed at the second registered intermolt stage. Some of the removed eyestalks were collected for sinus gland (SG) extract preparation. SG were dissected from eyestalks, frozen (-80 °C) and homogenized in cold PBS 1X with a pestle. The homogenized sample was centrifuged (10,500 x *g*, 4 °C, 15 min), and the collected supernatant was lyophilized and resuspended in 50 µL of PBS 1X every 2 glands. The SG extract was stored at -80 °C before activity assay.

Bilaterally eyestalk-ablated shrimp in intermolt were fasted for 24 h before the experiment. To establish the dose-dependent effect of rCHH-B1 on osmoregulation, various doses of rCHH-B1 peptide (5, 10, 50, 100, 250, 500, and 1000 pmol) were diluted in 50 µL of PBS 1X and injected into shrimp through the arthroal membrane with a 1 mL sterile syringe (31 G). As a negative control, a group of animals was injected with 50 µL of PBS 1X. The positive control group consisted of shrimp injected with a pair of SG extracted in PBS (50 µL). One hour after injection, six shrimp from each dosage treatment and control (n= 6) were sampled. Hemolymph was collected from shrimp with a sterile syringe (1 mL, 27 G) and immediately placed on ice before analysis. After that, posterior gills (~50 mg) were dissected from each animal and immersed in RNA stabilizing solution (25 mM sodium citrate, 10 mM EDTA, 70% (NH₄)₂SO₄ (w/v), pH 5.2). Tissue samples were stored at -80°C before RNA isolation.

Osmoregulatory capacity (OC)

The osmotic pressure (OP) was measured from hemolymph samples with a vapor pressure osmometer (VAPRO 5520, Wescor, South Logan, UT, USA). The OP of the external medium was also determined from seawater in the experimental reservoirs. The osmoregulatory capacity (OC) was calculated by subtracting OP of the external medium from that of hemolymph. Because penaeid shrimp are hyper-regulators of hemolymph OP under hyper-osmotic conditions of salinity, the OC data was expressed as hypo-OC (Lignot *et al.*, 1997).

NKA mRNA quantification by RT-qPCR

The effect of rCHH-B1 on *NKA* mRNA expression in *L. vannamei* gills was measured by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) according to Camacho-Jiménez *et al.* (2018). Gill samples of shrimp from each treatment and control (n= 6) were pooled in groups of two organisms (n= 3) to add ~50 mg of tissue (same amount per shrimp). Total RNA was isolated from gills tissue samples and treated with DNase I with the Direct-zol™ RNA MiniPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Total RNA (~1 µg) was reverse-transcribed for cDNA synthesis with SuperScript™ III Reverse Transcriptase and oligo (dT)₂₀ primer (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A specific fragment for *NKA* catalytic α -subunit (122 bp) was amplified by RT-qPCR in a StepOnePlus™ Real-Time PCR

System (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The reaction mix (10 µL) included 5 µL of Power SYBR® Green PCR Mix (Applied Biosystems, Life Technologies), cDNA (25 ng), 0.1 µM of LvaATP_F forward primer (5'-AGCAAGGC-CATCAACGATCT-3') and 0.1 µM of LvaATP_R reverse primer (5'-GCCCACTGCACAATCACAAT-3') (Li *et al.*, 2009). Cycling conditions were as follows: an initial denaturation cycle at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 20 s and 60 °C for 1 min. Each cDNA sample was analyzed in triplicates. In each run, a non-template control (negative control) was included in triplicates. After the last extension step, a melting curve was run from 60 to 95 °C with an increase of 0.3 °C each 15 s to validate the amplification specificity. The absolute copy number of *NKA* transcripts in samples was assessed by interpolating the quantification cycle (Cq) values of each sample to a standard curve (R² ≥ 0.99) constructed with serial dilutions (10⁷-10² copies) of a pCR™ 2.1-TOPO® plasmid (Life Technologies) carrying the 122 bp *NKA* fragment (Camacho-Jiménez *et al.*, 2018). The copy number of *NKA* transcripts in each sample was reported per ng of cDNA. The efficiency of primers was calculated using raw fluorescence data from the standard curve with LinRegPCR Software 2016.0 (Ruijter *et al.*, 2009), which was 91.6%.

Statistical analyses

Data were analyzed for normality and homoscedasticity by Shapiro-Wilk and Brown-Forsythe tests, respectively. To determine statistical differences in OC between PBS control and neuropeptide doses, one-way ANOVA with Fisher's LSD test was performed. Because *NKA* expression data did not satisfy normality and homoscedasticity criteria, a Kruskal-Wallis test with Dunn's *post hoc* test was performed to find differences between hormone treatments and negative control. All the statistical analyzes were done with SigmaPlot 14.0 (Systat Software) with a significance level settled at p < 0.05. The data were plotted as mean ± standard deviation.

RESULTS

Expression and purification of rCHH-B1

The expression and purification of the native recombinant protein were corroborated by Western blot analysis (Fig. 1). The results showed rCHH-B1 as a ~10 kDa band, which is close to the predicted mass of 8.8 kDa. This band was identified as rCHH-B1 by N-terminal sequencing in a previous study (Camacho-Jiménez *et al.*, 2015). No additional bands were detected during the analyses, confirming the elimination of contaminating proteins.

Effect of rCHH-B1 dosage on the hypo-OC of eyestalk ablated shrimp

The effect of the purified rCHH-B1 on the osmoregulatory capacity was evaluated in bilaterally-eyestalk ablated shrimp acclimated to 35 ppt salinity by a dose-response *in vivo* assay. Compared to PBS control (-287.27 ± 13.35 mmol kg⁻¹), rCHH-B1 increased the hypo-OC of the shrimp (Fig. 2) due to a decrease in the osmotic pressure of the hemo-

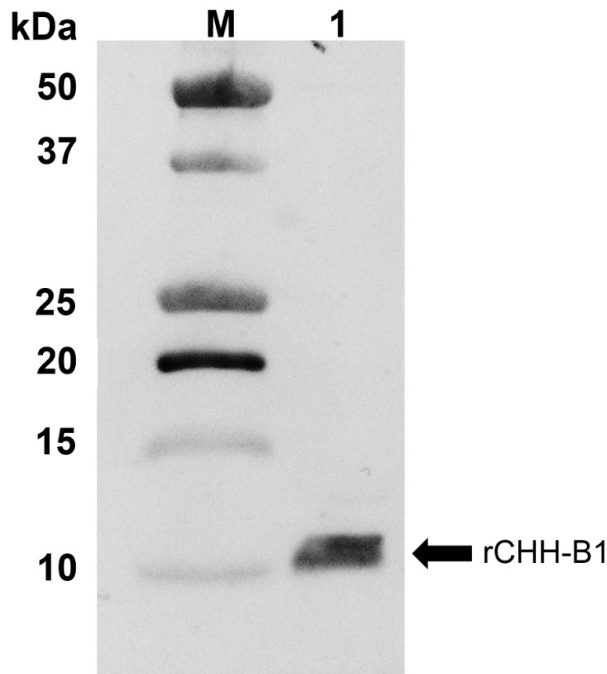


Figure 1. Immunodetection of rCHH-B1 by Western blot. M, molecular weight marker Precision Plus Protein All Blue (Bio-Rad); 1, recombinant protein purified by RP-HPLC. The arrow indicates the band corresponding to rCHH-B1.

Figura 1. Análisis por Western blot de rCHH-B1. M, marcador de pesos moleculares Precision Plus Protein All Blue (Bio-Rad); 1, proteína recombinante purificada por RP-HPLC. La flecha indica la banda correspondiente a rCHH-B1.

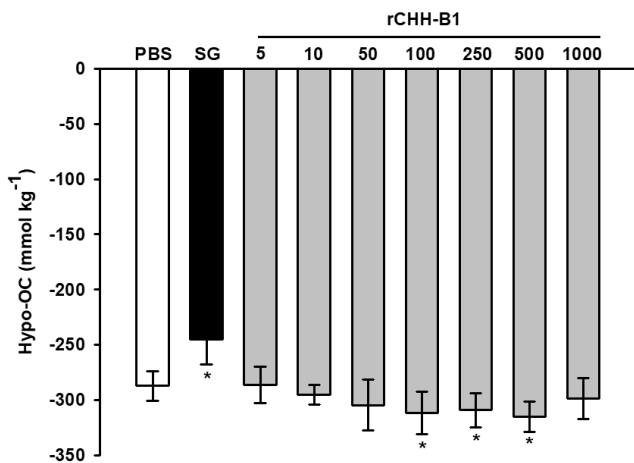


Figure 2. Dose-response effect of rCHH-B1 on the hypo-OC of *L. vannamei*. PBS, negative control; SG, sinus gland extract; rCHH-B1, doses of rCHH-B1 (5-1000 pmol). Data are expressed as mean \pm standard deviation ($n = 6$, per dosage or control). Asterisks (*) indicate significant differences with respect to PBS control ($p < 0.05$).

Figura 2. Efecto dosis-respuesta de rCHH-B1 sobre la hipoc-O de *L. vannamei*. PBS, control negativo; SG, extracto de glándula del seno; rCHH-B1, dosis de rCHH-B1 (5-1000 pmol). Los datos se expresan como media \pm desviación estándar ($n = 6$, por dosis o control). Los asteriscos (*) indican las diferencias con respecto al control PBS ($p < 0.05$).

lymph. The effect was significant ($p < 0.05$) starting from the 100 pmol dose (-311.78 ± 19.15 mmol kg⁻¹) and showed no differences ($p > 0.05$) with the effect of higher doses of hormone (250-500 pmol). The shrimp injected with SG showed a significant decrease ($p < 0.05$) in the hypo-OC (-245.00 ± 22.63 mmol kg⁻¹) with respect to PBS due to an increase of the hemolymph OP.

Effect of rCHH-B1 dosage on NKA expression

The expression of *NKA* in the posterior gills decreased in response to rCHH-B1 injection in a dose-dependent manner (Fig. 3). The reduction in *NKA* mRNAs was significant ($p < 0.05$) with respect to the PBS control ($15.76 \pm 4.39 \times 10^3$ copies of *NKA* transcript per ng of cDNA) starting from the 50 pmol dose ($9.51 \pm 2.88 \times 10^3$ copies of *NKA* transcript per ng of cDNA), which was lower than the effective dose found for the OC. The expression reached minimum values ($p < 0.05$) by injecting 1000 pmol of rCHH-B1 ($3.68 \pm 0.81 \times 10^3$ copies of *NKA* transcript per ng of cDNA). Conversely, the SG extract increased the *NKA* transcripts ($41.95 \pm 0.92 \times 10^3$ copies of *NKA* transcript per ng of cDNA) in comparison to the PBS control ($p < 0.05$).

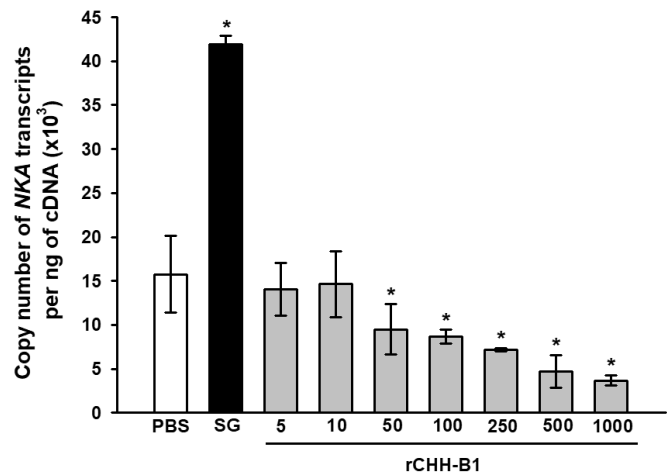


Figure 3. Dose-response effect of rCHH-B1 on *NKA* expression in posterior gills of *L. vannamei*. PBS, negative control; SG, sinus gland extract; rCHH-B1, doses of rCHH-B1 (5-1000 pmol). Data are expressed as mean \pm standard deviation ($n = 3$, per dosage or control). Asterisks (*) indicate significant differences with respect to PBS control ($p < 0.05$).

Figura 3. Efecto dosis-respuesta de rCHH-B1 sobre la expresión de *NKA* en branquias posteriores de *L. vannamei*. PBS, control negativo; SG, extracto de glándula del seno; rCHH-B1, dosis de rCHH-B1 (5-1000 pmol). Los datos se expresan como media \pm desviación estándar ($n = 3$, por dosis o control). Los asteriscos (*) indican las diferencias con respecto al control PBS ($p < 0.05$).

DISCUSSION

The CHHs are neuropeptides of crustaceans with a well-established role in carbohydrate metabolism (Fanjul-Moles, 2006). Experiments injecting rCHH-B1 into eyestalk-ablated *L. vannamei* have demonstrated its participation in controlling the hemolymph glucose levels (Camacho-Jiménez *et al.*, 2015). The CHH-mediated hyperglycemia has been proposed as an adaptive response to cope with increases in the energy needs of tissues during stressful situations

(Chang, 2005). Nonetheless, the CHHs are recognized as pleiotropic hormones with multiple functions proposed in the physiology of crustaceans, including osmo-ionic regulation (Chung *et al.*, 2010; Webster *et al.*, 2012). Interestingly, CHH-B1 mRNA levels were up-regulated in *L. vannamei* eyestalks during exposure to extreme salinities, pointing to a role in osmoregulation under osmotic stress (Lago-Lestón *et al.*, 2007). Additionally, the relative expression of the *chh* transcripts showed to be sensitive to salinity, being higher at salinities far from iso-osmotic point (26 ppt). Recent studies have shown that rCHH-B1 injection into *L. vannamei* shrimp acutely exposed to iso-osmotic (26 ppt) and hyper-osmotic salinity (45 ppt) increased *NKA* α -subunit mRNA expression in posterior gills (Camacho-Jiménez *et al.*, 2018). However, since this study was done with non-ablated shrimp, the effect of other endocrine molecules present in the eyestalks could not be ruled out. Diverse biogenic amines that are produced in the eyestalks may affect metabolism and osmoregulation in a way that can be or not dependant on CHH action (Liu *et al.*, 2008; 2009; Lorenzon *et al.*, 2005). Moreover, according to experiments in *Penaeus monodon*, other eyestalk peptides, like the red concentrating hormone, can elicit changes in *NKA* activity in gills, suggesting that it may exert an overlapping endocrine function to CHHs in osmoregulation (Sathapondecha *et al.* 2014). Eyestalk ablation is used to eliminate the primary source of neuropeptides in crustaceans to test their individual effects. Although this surgical procedure causes impairments in metabolism and osmoregulation by itself (Charmantier-Daures *et al.*, 1994; Sainz-Hernández *et al.*, 2008), it is still a classic approach for the functional characterization of CHHs, as it completely eliminates XO-SG, which is the main tissue secreting CHH (Chang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014; Mosco *et al.*, 2015).

In this study, the experiments were performed with bilaterally eyestalk-ablated sub-adult shrimp acclimated to hyper-osmotic conditions (35 ppt), in which organisms are hypo-osmotic with respect to the external medium. Interestingly, rCHH-B1 treatment increased the hypo-OC of eyestalk-ablated shrimp after 1 h within a dose range of 100-500 pmol due to a reduction in the hemolymph OP. These results agree with a previous study in which the injection of 226 pmol (2 μ g) of rCHH-B1 increased hypo-OC of non-ablated shrimp after 1 h (Camacho *et al.*, 2018). Thus, the evidence herein confirms that CHH-B1 acts on the osmoregulatory performance of shrimp during hypo-osmoregulation at high salinities besides its metabolic effects. Considering that in *L. vannamei*, the Na^+ and Cl^- ions comprise ~80% of the hemolymph OP at 35 ppt (Castille and Lawrence, 1981), the effect of rCHH-B1 on the hypo-OC could be related to changes in their concentrations, in part by modifying branchial ion transport. The rCHH-B1 peptide suppressed *NKA* expression in gills of eyestalk-ablated shrimp in a dose-dependent way, starting at a dosage that is a half lower than the effective dosage for the OC (100 pmol). These results indicate that CHH-B1 might regulate the OC of shrimp during hypo-regulation by modulating *NKA* activity. *NKA* modulation could occur

through a signal transduction pathway that triggers changes at a transcriptional level.

In euryhaline hyper-osmoregulator crustaceans, the catalytic α -subunit of *NKA* located in the basolateral membrane of epithelial cells from gills provides the primary driving force for the uptake of Na^+ from diluted media by exchanging K^+ (Lucu and Towle, 2003). The *NKA* mRNA expression was stimulated in *L. vannamei* gills in response to salinity stress (Sun *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). A high *NKA* gene expression level has also been observed in the gill tissue of black tiger shrimp (*P. monodon*) exposed to high salinity conditions (55 ppt) (Shekhar *et al.*, 2014). Additionally, a transient induction of the mRNA levels for the α -subunit of *NKA* has been reported during acclimation of the euryhaline blue crabs *Callinectes sapidus* from 35 ppt to 10 ppt salinity (Lovett *et al.*, 2006). *NKA* expression in the euryhaline crab *Eriocheir sinensis* gills showed adaptive up-regulated expression response to the salinity changes (Zhang *et al.*, 2018). In contrast, *NKA* expression in the *E. sinensis* gills was significantly downregulated in organisms acclimated to seawater (25 ppt) compared with the freshwater group (Yang *et al.*, 2019). Nonetheless, in animals capable of hypo-osmoregulation, like *L. vannamei*, branchial *NKA* could also drive the movement of ions through the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter and other transport proteins in cell membranes, as has been suggested in some marine teleosts (Evans *et al.*, 2005). These results suggest the importance of tight regulation of *NKA* activity for the survival of crustacea to osmotic stress caused by both high and low salinities. The effect of rCHH-B1 on *NKA* expression found in this work, in which organisms were acclimated at 35 ppt, contrast with those reported in a previous study in which a transitory up-regulation in transcript copy number occurred in shrimp treated with rCHH-B1 (226 pmol) and acutely transferred to hyper-osmotic (45 ppt) conditions (Camacho-Jiménez *et al.*, 2018). Since the optimum salinity range for *L. vannamei* growth is 33-40 ppt and survival is compromised at salinities above 40 ppt (Ponce-Palafox *et al.*, 1997), the level of stress experienced by animals at 35 ppt probably was not the same as at 45 ppt. In agreement, shrimp acclimated to iso-osmotic salinity (26 ppt) and injected with rCHH-B1 or rCHH-B2, displayed a weaker effect on *NKA* induction than shrimp acutely transferred to 45 ppt. Moreover, the transference of animals injected with the recombinant peptides to low salinity (8 ppt) for 1 h did not induced *NKA* expression. However, the authors also reported a less-magnitude increase in shrimp under the same salinity conditions that not received hormone injection, which suggests that other endocrine factors involved in osmoregulation could be acting under salinity stress (Camacho-Jiménez *et al.*, 2018).

Results presented in this study showed that eyestalk-ablated shrimp injected with the SG extract had an strong and opposite response to that of rCHH-B1 treatments. SG extract caused a reduction in hypo-OC (increase in OP) and an increase in *NKA* transcripts, suggesting an increase in ion uptake dependant on *NKA* activity. The SG extract contains a mixture of endocrine molecules (i.e., biogenic amines and

neuropeptides) that potentially have different effects on the osmo-ionic regulation of *L. vannamei* (Liu *et al.*, 2008; 2009). Thus, differences among intact and eyestalk-ablated animals can be expected, as well as between the effects of SG extract and single CHH neuropeptides. In this sense, recent studies revealed that the rCHH-B2 variant decrease the hypo-OC in the hemolymph of bilaterally eyestalk-ablated *L. vannamei* exposed to 35 ppt (Camacho-Jiménez *et al.*, 2017b). CHH-B2 has also been shown to increase the hemolymph ion concentrations and *NKA* expression in gills of non-ablated shrimp transferred to high salinity (45 ppt) (Camacho-Jiménez *et al.*, 2018). Liu *et al.* (2014) reported that recombinant CHH peptide of *L. vannamei* (rLvCHH) increased the *NKA* activity in intact shrimp acclimated to 31 ppt.

Interestingly, CHH variants of *L. vannamei* are differentially distributed among tissues. LvCHH peptide is highly expressed in eyestalks, heart, nervous systems, muscle, and hepatopancreas (Liu *et al.*, 2014), while CHH-B2 has been only detected in eyestalks (Lago-Lestón *et al.*, 2007). Moreover, *L. vannamei* ion transport peptide (LvITP), a peptide with high sequence identity with CHH-B1, is expressed in gills, suggesting an osmoregulatory role in this tissue (Tiu *et al.*, 2007). These dissimilarities between tissue distribution patterns of CHHs have been related to their structural variability, as well as to their functional diversity (Liu *et al.*, 2015).

The involvement of CHHs in osmotic adaptation has been mostly studied in crustaceans upon transfer to hypo-osmotic environments. In lobster and crayfish species, the injection of purified CHH reverted the reduction in the ability to regulate the internal OP and/or Na⁺ in eyestalk ablated animals kept in diluted media (Charmantier-Daures *et al.*, 1994; Serrano *et al.*, 2003), probably by promoting changes in the transepithelial potential and Na⁺ influx across the posterior gills, as has been shown in *Pachygrapsus marmoratus* (Spanings-Pierrot *et al.*, 2000). In agreement with our findings, Spanings-Pierrot *et al.* (2000) suggested that CHH could indirectly modulate the *NKA* activity in gills by controlling the metabolic energy available for this mechanism. rCHH-B1 has been demonstrated to cause hyperglycemia in eyestalk-ablated shrimp at 35 ppt (Camacho-Jiménez *et al.*, 2015). Moreover, rCHH-B1 has proven to elicit triglycerides and phospholipids mobilization into hemolymph, making lipids available for uptake by tissues (Montiel-Arzate *et al.*, 2020). In this sense, unsaturated phospholipid content in posterior gills tissue has been positively related to the level of *NKA* activity (Chapelle and Zwingelstein, 1984). Thus, the metabolic effects of CHH-B1 in hemolymph and gill tissue can aid shrimp to osmoregulate in changing environmental conditions. Alternatively, CHH may be directly involved in the activation of signal transduction pathways that control *NKA* activity. Specific binding sites for CHH have been detected in the gills tissue from *Carcinus maenas* and *C. sapidus*, where the hormone rises the cGMP concentration (Chung and Webster 2006; Katayama and Chung, 2009). Moreover, it has been predicted that the *NKA* α -subunit of the euryhaline crab *P.*

marmoratus has a cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site, while in the promoter region of the α -subunit gene potential recognition sites have been located for activating transcription factor/cAMP response element-binding protein (ATF/CREB) (Jayasundara *et al.*, 2007). This family of transcription factors is involved in the cellular stress response in mammalian cell lines (Fawcett *et al.*, 1999). In this sense, the existence of a signal transduction pathway dependant on CHH and cyclic nucleotides (as second messengers) that controls *NKA* expression must be elucidated.

CONCLUSIONS

Based on our results, CHH-B1 is involved in the osmotic regulation of *L. vannamei*, which is correlated with the transcriptional regulation of *NKA* activity in gills. The rCHH-B1 peptide had a dose-dependent suppressive effect on *NKA* expression in gills of eyestalk-ablated shrimp acclimated to 35 ppt. Even though these results support a regulatory role for CHH in osmo-ionic regulation in crustaceans, they contrast with previous evidence on CHH-dependant stimulation of Na⁺ uptake and *NKA* activity in gills (Spanings-Pierrot *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2014; Camacho-Jiménez *et al.*, 2018). However, salinity conditions seem to have a significant influence on gene expression and activities of CHH variants of *L. vannamei* (Lago-Lestón *et al.*, 2007; Camacho-Jiménez *et al.*, 2018). Moreover, osmoregulation appears to be a highly complex physiological process involving diverse endocrine molecules with unknown interactions among each other (Charmantier *et al.*, 2009). Further research is needed to clarify the signal transduction pathways and the effects of the different CHH peptides of *L. vannamei* under diverse environmental and physiological conditions. The study of their effects in response to stressors, such as salinity fluctuations, could be interesting for aquaculture production since they impact the growth, health, and even survival of shrimp.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the support from the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACyT) under Grant CB2009-133958-Z (to E. P-R). We thank to Dr. John van der Meer for his help in improving the English redaction of the manuscript. We thank Yesenia Balderas González and Roberto Arredondo Espinoza for helping in sample collection.

REFERENCES

- Camacho-Jiménez, L., Sánchez-Castrejón, E., Ponce-Rivas, E., Muñoz-Márquez, M.E., Aguilar, M.B., Re, A.D., Díaz, F. 2015. Hyperglycemic activity of the recombinant crustacean hyperglycemic hormone B1 variant (CHH-B1) of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Peptides*. 71: 32-39.
- Camacho-Jiménez, L., Díaz, F., Muñoz-Márquez, M.E, Farfán, C., Re, A.D., Ponce-Rivas, E. 2017a. Hyperglycemic and osmotic effects of dopamine and recombinant hormone CHH- B1 in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 50: 67-79.

- Camacho-Jiménez, L., Sánchez-Castrejón E., Díaz, F., Aguilar, M.B., Muñoz-Márquez, M.E., Ponce-Rivas, E. 2017b. Cloning and expression of the recombinant crustacean hyperglycemic hormone variant B2 (rCHH-B2) and its effects on the metabolism and osmoregulation of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *General and Comparative Endocrinology*. 253: 33-43.
- Camacho-Jiménez, L., Díaz, F., Sánchez-Castrejón, E., Ponce-Rivas, E. 2018. Effects of the recombinant crustacean hyperglycemic hormones rCHH-B1 and rCHH-B2 on the osmo-ionic regulation of the shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute salinity stress. *Journal of Comparative Physiology B*. 188: 565-579.
- Castille, F.L., Lawrence, A.L. 1981. The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 68: 75-80.
- Chang, E.S. 2005. Stressed-out lobsters: crustacean hyperglycemic hormone and stress proteins. *Integrative and Comparative Biology*. 45: 43-50.
- Chapelle, S., Zwingelstein, G. 1984. Phospholipid composition and metabolism of crustacean gills as related to changes in environmental salinities: relationship between Na⁺-K⁺-ATPase activity and phospholipids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 78: 363-372.
- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Aiken, D.E. 1984. Neuroendocrine control of hydromineral regulation in the american lobster *Homarus americanus* H. Milne-Edwards 1837 (Crustacea, Decapoda) 1. Juveniles. *General and Comparative Endocrinology*. 54: 8-19.
- Charmantier-Daures, M., Charmantier, G., Janssen, K.P.C., Aiken, D.E., Van Herp, F. 1994. Involvement of eyestalk factors in the neuroendocrine control of osmoregulation in adult american lobster *Homarus americanus*. *General and Comparative Endocrinology*. 94: 281-293.
- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Towle, D. 2009. Osmotic and ionic regulation in aquatic arthropods. En: *Osmotic and Ionic Regulation: cell and animals*. D.H. Evans (ed), pp. 165-230. Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Chong-Robles, J., Charmantier, G., Boulo, V., Lizarraga-Valdéz, J., Enríquez-Paredes, L.M., Giffard-Mena, I. 2014. Osmoregulation pattern and salinity tolerance of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) during post-embryonic development. *Aquaculture*. 422-423: 261-267.
- Chung, J.S., Webster, S.G. 2006. Binding sites of crustacean hyperglycemic hormone and its second messengers on gills and hindgut of the green shore crab, *Carcinus maenas*: a possible osmoregulatory role. *General and Comparative Endocrinology*. 147: 206-213.
- Chung, J.S., Zmora, N., Katayama, H., Tsuitsui, N. 2010. Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) neuropeptides family: functions, titer, and binding to target tissues. *General and Comparative Endocrinology*. 166: 447-454.
- Díaz, F., Farfán, C., Sierra, E., Re, A.D. 2001. Effects of temperature and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation of juveniles of *Penaeus vannamei*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 34: 93-104.
- Evans, D.H. Evans, D. H., Piermarini, P. M., Choe, K. P. 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews*. 85: 97-177.
- Fanjul-Moles, M.L. 2006. Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: review and update. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 142: 390-400.
- Fawcett, T.W., Martindale, J.L., Guyton, K.Z., Hai, T., Holbrook, N.J. 1999. Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *Biochemical Journal*. 339: 135-141.
- Henry, R.P., Lucu, Č., Onken, H., Weihrauch, D. 2012. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Frontiers in Physiology*. 3: 1-33.
- Holthius, L.B. 1980. FAO species catalogue. Vol.1. Shrimps and prawns of the world. FAO Fisheries Synopsis no. 125.
- Jayasundara, N., Towle, D.W., Weihrauch, D., Spanings-Pierrot, C. 2007. Gill-specific transcriptional regulation of Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit in the euryhaline shore crab *Pachygrapsus marmoratus*: sequence variants and promoter structure. *Journal of Experimental Biology*. 210: 2070-2081.
- Kamemoto, F.I. 1976. Neuroendocrinology of osmoregulation in decapod Crustacea. *American Zoologist*. 16: 141-150.
- Katayama, H., Chung, J.S. 2009. The specific binding sites of eyestalk- and pericardial organ-crustacean hyperglycaemic (CHHs) in multiples tissues of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Journal of Experimental Biology*. 212: 42-49.
- Lago-Lestón, A., Ponce, E., Muñoz-Márquez, M.E. 2007. Cloning and expression of hyperglycemic (CHH) and molt-inhibiting (MIH) hormones mRNAs from the eyestalk of shrimps of *Litopenaeus vannamei* grown in different temperature and salinity conditions. *Aquaculture*. 270: 343-357.
- Lignot, J.H., Trilles, J.P., Charmantier, G. 1997. Effect of an organophosphorus insecticide, fenitrothion, on survival and osmoregulation of various developmental stages of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *Marine Biology*. 128: 307-316.
- Li, E., Arena, L., Chen, L., Quin, J.G., Van Wormhoudt, A. 2009. Characterization and Tissue-Specific Expression of the two glutamate dehydrogenase cDNAs in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Crustacean Biology*. 29: 379-386.
- Liu, H.Y., Pan, L.Q., Zheng, D.B. 2008. Injection of biogenic amines modulates osmoregulation of *Litopenaeus vannamei*: response of hemolymph osmotic pressure, ion concentration and osmolality effectors. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 151: 191-197.
- Liu, H.Y., Pan, L.Q., Zheng, D.B. 2009. Effects of injection of biogenic amines on expression of gill related ion transporter mRNA and α -subunit protein in *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 154: 29-36.
- Liu, M., Pan, L., Li, L., Zheng D. 2014. Molecular cloning, characterization and recombinant expression of crustacean hyperglycemic hormone in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Peptides*. 53: 115-124.
- Liu, C.J., Huang, S.S., Toullec, J.Y., Chang, C.Y., Chen, Y.R., Huang, W.S., Lee, C.Y. 2015. Functional assessment of residues in the amino- and carboxyl-termini of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the mud crab *Scylla olivacea* using point-mutated peptides. *PLoS One*. 10:e0134983.

- Lorenzon, S. 2005. Hyperglycemic stress response in crustaceans. *Invertebrate Survival Journal*. 2: 131-141.
- Lovett, D.L., Verzi, M.P., Burgents, J.E., Tanner, C. A., Glomski, K., Lee, J.J., Towle, S.W. 2006. Expression profiles of Na⁺,K⁺-ATPase during acute and chronic hypo-osmotic stress in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Biology Bulletin*. 211: 58-65.
- Lucu, Ć., Towle, D.W. 2003. Na⁺ + K⁺-ATPase gills of aquatic crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 135: 195-214.
- Mantel, L.H. 1985. Neurohormonal integration of osmotic and ionic regulation. *American Zoologist*. 25: 253-263.
- Montiel-Arzate, A., Sánchez-Castrejón, E., Camacho-Jiménez, L., Díaz, F., Ponce-Rivas, E. 2020. Effect of recombinant crustacean hyperglycemic hormones rCHH-B1 and rCHH-B2 on lipid metabolism in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*. 51: 4267-4278.
- Mosco, A., Zlatev, S., Guarnaccia, C., Giulianini, P.G. 2015. Functional analysis of a mutated analogue of the crustacean hyperglycemic hormone from the crayfish *Pontastacus leptodactylus*. *Journal of Experimental Zoology Part A*. 323: 121-127.
- Péqueux, A. 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*. 15: 1-60.
- Ponce-Palafox, J., Martínez-Palacios, C.A., Ross, L.G. 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture*. 157: 107-115.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J.B., Moorman A.F.M. 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*. 37:e45.
- Sainz-Hernández, J.C., Racotta, I.S., Dumas, S., Hernández-López, J. 2008. Effect of unilateral and bilateral eyestalk ablation in *Litopenaeus vannamei* male and female on several metabolic and immunologic variables. *Aquaculture*. 283: 188-193.
- Sánchez-Castrejón, E., Ponce-Rivas, E., Aguilar, M.B., Díaz, F. 2008. Molecular cloning and expression of a putative crustacean hyperglycemic hormone of *Litopenaeus vannamei* in *Pichia pastoris*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 11: 9-10.
- Sathapondecha, P., Panyim, S., Udomkit, A. 2014. Molecular characterization of a cDNA encoding red pigment-concentrating hormone in black tiger shrimp *Penaeus monodon*: implication of its function in molt and osmoregulation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 175: 124-130.
- Serrano, L., Blanvillain, G., Soye, D., Charmantier, G., Grousset, E., Aujulat, G., Spanings-Pierrot, C. 2003. Putative involvement of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Journal of Experimental Biology*. 206: 979-988.
- Shekhar, M.S., Kiruthika, J., Rajesh, S., Ponniah, A.G. 2014. High salinity induced expression profiling of differentially expressed genes in shrimp (*Penaeus monodon*). *Molecular Biology Reports*. 41: 6275-6289.
- Spanings-Pierrot, C., Soye, D., Van Herp, F., Gompel, M., Skaret, G., Grousset, E., Charmantier, G. 2000. Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the control of gill ion transport in the crab *Pachygrapsus marmoratus*. *General and Comparative Endocrinology*. 119: 340-350.
- Sun, H., Zhang, L., Ren, C., Chen, C., Fan, S., Xia, J. J., Lin, H., Hu, C. 2011. The expression of Na, K-ATPase in *Litopenaeus vannamei* under salinity stress. *Marine Biology Research*. 7: 623-628.
- Tiu, S.H., He J.G., Chan, S.M. 2007. The LvCHH-ITP gene of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*) produces a widely expressed putative ion transport peptide (LvITP) for osmo-regulation. *Gene*. 396: 226-235.
- Ventura-López, C., Gómez-Anduro, G., Arcos, F.G., Llera-Herrera, R., Racotta, I.S., Ibarra, A.M. 2016. A novel CHH gene from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* was characterized and found highly expressed in gut and less in eyestalk and other extra-eyestalk tissues. *Gene*. 582: 148-160.
- Wang, L., Wang, W., Liu, Y., Cai D. X., Li J. Z., Wang, A. L. 2012. Two types of ATPases from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to environmental stress. *Molecular Biology Reports*. 39: 6427-6438.
- Webster, S.G., Keller, R., Dirksen, H. 2012. The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, moulting, and reproduction. *General and Comparative Endocrinology*. 175: 217-233.
- Yang, Z., Zhou, J., Wei, B., Cheng, Y., Zhang, L., Zhen, X. 2019. Comparative transcriptome analysis reveals osmotic-regulated genes in the gill of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *PLOS One*. 14: e0210469.
- Zhang, D., Tingting, Q., Liu, J., Liu. Q., Jiang S., Zhang, H., Wang, Z., Ding G., Tang, B. 2018. Adaptively differential expression analysis in gill of Chinese mitten crabs (*Eriocheir japonica sinensis*) associated with salinity changes. *International Journal of Biological Macromolecules*. 120: 2242-2246.

Extraction of phenolic compounds from agro-industrial by-products by fungal fermentation with potential use as additives for meat and meat products. A review

Extracción de compuestos fenólicos de subproductos agroindustriales por fermentación fúngica con uso potencial como aditivos para carne y productos cárnicos. Revisión

Rey David Vargas-Sánchez^{1**}, Brisa del Mar Torres-Martínez¹, Gastón Ramón Torrescano-Urrutia¹, Armida Sánchez-Escalante¹, Martín Esqueda²

¹ Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, No. 46, Col. La Victoria, CP 83304, Hermosillo, Sonora, México.

² Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, No. 46, Col. La Victoria, CP 83304, Hermosillo, Sonora, México.

‡ Cátedras CONACYT-CIAD, A.C.

ABSTRACT

The present manuscript reviews the findings of different research studies that evaluate the use of fungal fermentation-assisted extraction, in solid-state fermentation (SSF) and submerged culture fermentation (SCF) with agro-industrial residues as substrates, to obtain phenolic compounds with possible applications as food additives. Some agro-industrial by-products (peels, pulps and seeds) are an important source of phenolic acids such as *p*-coumaric, *p*-hydroxybenzoic, chlorogenic, cinnamic, ferulic, gallic, protocatechuic, rosmarinic, syringic, and vanillic acids and flavonoids (apigenin, chrysin, (+)-catechin, kaempferol, myricetin, quercetin, rutin, hesperetin, and naringin). In addition, the utilization of these by-products as substrates in SSF and SCF allowed obtaining phenolic compounds with antioxidant and antimicrobial activities. Thus, fungal fermentation-assisted extraction provides a potential alternative to obtain natural additives for meat and meat products industry.

Keywords: Mushroom, Fermentation, Compound extraction, Food additives

RESUMEN

El presente manuscrito revisa los hallazgos de diferentes estudios de investigación que evalúan el uso de la extracción-asistida por fermentación fúngica, en medio sólido (SSF) y cultivo sumergido (SCF) con subproductos agroindustriales como sustratos, para obtener compuestos fenólicos con posible uso como aditivos alimentarios. Algunos subproductos agroindustriales (pulpas, cáscaras y semillas) son una fuente importante de ácidos fenólicos como *p*-cumárico, *p*-hidroxibenzoico, clorogénico, cinámico, ferúlico, gálico, protocatecuico, rosmarínico, siríngico, y vanílico, y de flavonoides (apigenina, crisina, (+)-catequina, kaempferol, miricetina, quercetina, rutina, hesperetina y naringina). Además, la utilización de estos subproductos como sustratos en SSF y SCF permitió obtener compuestos fenólicos con actividad antioxidante y antimicrobiana. Por lo que,

la extracción-asistida por fermentación fúngica proporciona una alternativa potencial para obtener aditivos naturales para la industria de la carne y productos cárnicos.

Palabras clave: Hongos, Fermentación, Extracción de compuestos, Aditivos alimentarios.

INTRODUCTION

Meat and meat products are considered an important source of many essential nutrients in the human diet, including lipids such as fatty acids (mono- or polyunsaturated) and proteins rich in essential amino acids such as isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, and valine, which are highly susceptible to oxidation processes (Hammad *et al.*, 2020). Oxidative deterioration of lipids and proteins, and microbial growth are considered the main causes of quality loss in any type of meat or meat products leading to organoleptic and technological changes such as color, odor, flavor, appearance, and texture, as well as water holding capacity and water loss by cooking. In addition, both factors promote nutrient losses and toxic compound formation (Jiang and Xiong, 2016; Aziz and Karboune, 2018). However, the uncontrolled uses of antioxidant and antimicrobial additives to preserve meat and meat products is a practice that generate negative effects on consumer health; thus, strict regulations for their controlled used in foods has been promoted (Poljsak *et al.*, 2013; Aziz and Karboune, 2018).

In previous investigations to reduce lipid and protein oxidation and microbial growth in meat and meat products, extracts rich in phytochemicals have been obtained from plants, herbs, and species, and used instead of synthetic preservatives (Jiang and Xiong, 2016). In addition, the reuse of agro-industrial by-products such as peel pomace and seeds offers an alternative source of additives with antioxidant and antimicrobial properties (Hernández-Carlos *et al.*, 2019).

Moreover, several extraction methods have been developed to obtain bioactive compounds from agro-industrial by-products, such as conventional (maceration and

hydrodistillation extraction) and unconventional (ultrasonic, microwave, supercritical fluid, and enzyme extraction) methods. These extraction methods in combination with a solvent system of different polarities, including water, acetone, ethanol, methanol, hexane, and petroleum ether, improve the types of compounds that can be extracted (Azmir *et al.*, 2013; Hernández-Carlos *et al.*, 2019). However, biotechnological methods such as fungal fermentation-assisted extraction (SSF and SCF) has been suggested as an additional alternative to obtain bioactive compounds from agro-industrial by-products (Papaspyridi *et al.*, 2012; Santana-Méridas *et al.*, 2012). In this review, a general description of the uses of fungal fermentation-assisted extraction (SSF and SCF) to obtain phenolic compounds from agro-industrial by-products, and their possible applications as food additives are discussed.

Phenolic Compounds from Agro-Industrial By-Products

The definition of food losses and waste could be associated with a reduction in the availability of food, a decrease in nutritional value and a deterioration in food safety, involving many players in food supply chains, such as farmers and processors. Furthermore, food losses could occur by accidental causes (intrinsic or extrinsic factors), and food waste occurs for reasons of negligence (FAO, 2017). The Mexican normative (NOM-251-SSA1-2009) defines food residue/by-product as 'waste from processed raw material'. In this regard, the food processing industry generates large amounts of by-products, including pomace, husks, seeds, leaves, stems, and wood (Peanparkdee and Iwamoto, 2019; Rico *et al.*, 2020). In some cases, these by-products are treated to decrease negative environmental impact, making them a useful product with the added benefits of solving a problem and generating additional income (Rico *et al.*, 2020).

Agro-industrial by-products are commonly disposed of, used on-site or used off-site or after pre-treatment. These can be pre-treated by physicochemical (combustion, pyrolysis, and gasification) or biochemical (anaerobic digestion and fermentation) processes, to generate biodiesel and electricity or bio-alcohol and biogas, respectively. In addition, agro-industrial by-products can be pre-treated by bio-reduction to produce animal feed, and by chemical modifications, and by SSF and SCF to obtain bioactive compounds (Santana-Méridas *et al.*, 2012). Thus, agro-industrial by-products are considered a rich source of bioactive compounds, including alkaloids, terpenoids, saponins, essential amino acids and fatty acids, minerals, carotenoids, vitamins, polysaccharides, and phenolic compounds like phenolic acids, and flavonoids (Wijngaard *et al.*, 2012; Azmir *et al.*, 2013; Peanparkdee and Iwamoto, 2019; Rico *et al.*, 2020).

The major by-products of fruit processing are peel and seed, and in a minor proportion, pulp (Santana-Méridas *et al.*, 2012). However, the extraction, identification and uses of phenolic compounds are widely investigated in commercial sectors such as the pharmaceutical, chemical, and food industries (Azmir *et al.*, 2013; Santana-Méridas *et al.*, 2012). In this context, table 1 compiled literature reports

of these residues as an important source of phenolic acids, including peel (apple, potato, and tomato), pulp (avocado) and seeds (avocado, citrus, and tomato). In addition, table 2 demonstrate that by-products also are a significant source of flavones, flavonols, and flavanones compounds. It has been reported that phenolic compounds are present ubiquitously in all parts of plants such as wood, leaves, roots, and fruits (Vermerris and Nicholson, 2008; Rico *et al.*, 2020). In this regard, these compounds are commonly trapped or bound to the dietary fiber of plant material, through hydrogen bonds between the phenol hydroxyl group (HO⁻) of the phenolic component, hydrophobic interactions, and covalent bonds like ester bond between phenolic acids and polysaccharides (Quirós-Sauceda *et al.*, 2011).

Chemical structure plays a key role in the bioactivity of phenolic compounds, which have been associated with several key factors such as OH-group location in the benzene ring, the substitution patterns by the OH-group (*ortho*-, *meta*-, *para*-, *meta-tri*-, *vic-tri*-), the presence of glycosylation, and double bounds in the benzene structure (Vermerris and Nicholson, 2008; Rico *et al.*, 2020). However, the types of phenolic compounds obtained, and their bioactivity are closely associated with the extraction method employed (Azmir *et al.*, 2013).

Extraction Methods

Phenolic compounds are widely found as a mixture of different components in a solid, and for extraction that are dispersed in a liquid phase, which allows their separation from the solid phase. This process is known as liquid-solid extraction, and to increase the diffusion rate of the solvent in the solute and yields, it is necessary to dry and reduce the particle size of the solid or plant material (fruits, leaves, stem, roots, wood, flowers or seeds) (Pinelo *et al.*, 2007; Pronyk and Mazza, 2009; Orphanides *et al.*, 2013).

Furthermore, several methods are frequently employed to obtain phenolic compounds, including rustic methods (extraction by cooking, percolation, and infusion), conventional methods (extraction by maceration, Soxhlet, and hydrodistillation) and unconventional methods, including enzymes-assisted extraction, microwave-assisted extraction, pressurized liquid-assisted extraction, supercritical fluids-assisted extraction, and ultrasound-assisted extraction (Wijngaard *et al.*, 2012; Azmir *et al.*, 2013). However, the solvent type, solvent-solid ratio, number of extractions, pH, temperature, time, vacuum and fermentation process, among other conditions used, influences phenolic yields (Spigno *et al.*, 2007; Ramírez-Rojo *et al.*, 2018).

Fungal Culture Fermentation

SSF involves the fermentation of solids or semi-solids in the absence of water, where the substrate used to be the source of moisture to support microbial growth (Pandey, 2003; Castañeda-Casasola *et al.*, 2018), while in SCF, microorganisms grow submerged with an excess of water and limited oxygen (Castañeda-Casasola *et al.*, 2018). In this context,

Table 1. Basic structure of phenolic acids identified in some agro-industrial by-products.**Tabla 1.** Estructura básica de ácidos fenólicos identificados en algunos subproductos agroindustriales.

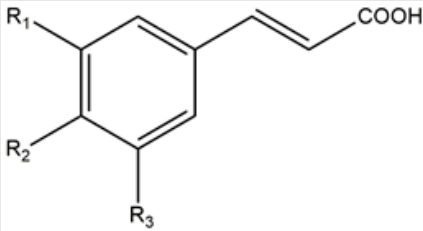
Basic structure						
						
Phenolic acids identified						
Compound	R1	R2	R3	-COOH	Source	Reference
<i>p</i> -coumaric acid	H	OH	H	*	Potato peel	Onyeneho and Hettiarachchy (1993)
					Apple peel	Łata et al. (2009)
					Tomato peel and seed	Valdez-Morales et al. (2014)
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	OH	H	H	*	Potato peel	Onyeneho and Hettiarachchy (1993)
					Avocado peel, pulp and seed	Rodríguez-Carpena et al. (2011)
					Citrus seed	Moulehi et al. (2012)
Caffeic acid	OH	OH	H	*	Potato peel	Onyeneho and Hettiarachchy (1993)
					Apple peel	Łata et al. (2009)
					Citrus seed	Moulehi et al. (2012)
					Tomato peel and seed	Valdez-Morales et al. (2014)
Chlorogenic acid	OH	OH	H	Esterified	Potato peel	Onyeneho and Hettiarachchy (1993)
					Apple peel	Łata et al. (2009)
					Citrus seed	Moulehi et al. (2012)
					Tomato peel and seed	Valdez-Morales et al. (2014)
Cinnamic acid	H	H	H	*	Potato peel	Onyeneho and Hettiarachchy (1993)
					Tomato peel and seed	Valdez-Morales et al. (2014)
Ferulic acid	OCH3	OH	H	*	Potato peel	Onyeneho and Hettiarachchy (1993)
					Citrus seed	Moulehi et al. (2012)
					Tomato peel and seed	Valdez-Morales et al. (2014)
Gallic acid	OH	OH	OH	*	Potato peel	Onyeneho and Hettiarachchy (1993)
					Citrus seed	Moulehi et al. (2012)
					Tomato peel and seed	Valdez-Morales et al. (2014)
Protocatechuic acid	H	OH	OH	*	Potato peel	Onyeneho and Hettiarachchy (1993)
Rosmarinic acid	OH	OH	H	Esterified	Citrus seed	Moulehi et al. (2012)
Syringic acid	OCH3	OH	OCH3	*	Potato peel	Onyeneho and Hettiarachchy (1993)
					Citrus seed	Moulehi et al. (2012)
Vanillic acid	H	OH	OCH3	*	Potato peel	Onyeneho and Hettiarachchy (1993)
					Citrus seed	Moulehi et al. (2012)
					Tomato peel and seed	Valdez-Morales et al. (2014)

Table 2. Basic structure of flavonoids identified in some agro-industrial by-products.**Tabla 2.** Estructura básica de algunos flavonoides identificados en subproductos agroindustriales.

Basic structure of flavonoids										
Flavonoids identified										
Compound	R3	R5	R7	R2'	R3'	R4'	R5'	C2-C3	Source	Reference
Flavones										
Apigenin	H	OH	OH	H	H	OH	H	+	Citrus seed Tomato peel and seed	Moulehi <i>et al.</i> (2012) Valdez-Morales <i>et al.</i> (2014)
Chrysin	H	OH	OH	H	H	H	H	+	Apple peel	Balasuriya and Rupasinghe (2012)
Flavanols										
(+) catechin	OH	OH	OH	H	H	OH	OH	-	Apple peel Avocado peel, pulp and seed Citrus seed	Łata <i>et al.</i> (2009) Rodríguez-Carpena <i>et al.</i> (2011) Moulehi <i>et al.</i> (2012)
Kaempferol	OH	OH	OH	H	H	OH	H	+	Citrus seed Tomato peel and seed	Moulehi <i>et al.</i> (2012) Valdez-Morales <i>et al.</i> (2014)
Myricetin	OH	OH	OH	H	OH	OH	OH	+	Tomato peel and seed	Valdez-Morales <i>et al.</i> (2014)
Quercetin	OH	OH	OH	H	OH	OH	H	+	Apple peel Citrus seed Tomato peel and seed	Łata <i>et al.</i> (2009) Moulehi <i>et al.</i> (2012) Valdez-Morales <i>et al.</i> (2014)
Rutin	Gly	OH	OH	H	OH	OH	H	+	Apple peel Citrus seed Tomato peel and seed	Łata <i>et al.</i> (2009) Moulehi <i>et al.</i> (2012) Valdez-Morales <i>et al.</i> (2014)
Flavanones										
Hesperetin	H	OH	OH	H	OH	OCH ₃	H	-	Citrus seed	Moulehi <i>et al.</i> (2012)
Naringin	H	OH	OH	H	H	OH	H	-	Apple peel Citrus seed Tomato peel and seed	Balasuriya and Rupasinghe (2012) Moulehi <i>et al.</i> (2012) Valdez-Morales <i>et al.</i> (2014)

(+) double; (-) single.

fungal mycelia is widely produced in SSF using substrates such as grains, sawdust or wood from different plant species (Yang and Liau, 1998). Nevertheless, it has been reported that SCF improves potential advantage than SSF, because inoculums can be uniformly dispersed in the substrate, and the time and/or harvest speed are reduced (Yang and Liau, 1998; Xu and Zhu, 2011; Xu *et al.*, 2015).

Moreover, fungal mycelia production during the fermentation process varies extensively, depending on the

species of fungus and environmental or culture conditions used (temperature, initial pH, surface-aeration, aeration rate, rotating speed, and stimulatory agents, among others), which consequently affect phytochemical extraction from the substrate (Yang and Liau, 1998; Xu and Zhu, 2011; Xu *et al.*, 2015).

Phenolic Compounds Extraction by Fungal Fermentation

In relation to the aforementioned, the use of agro-in-

dustrial by-products as substrates in combination with fungal fermentation-assisted extraction (SSF and SCF), are considered an alternative method for the extraction of phytochemicals, including triterpenoids, polysaccharides, and phenolic compounds, which could be obtained through agro-industrial by-products (Xu and Zhu, 2011; Xu *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015; Dey *et al.*, 2016).

In this context, the extraction of phenolic compounds and triterpenoids from citrus peel like pomelo, lemon, orange, and tangerine, through SCF (25 °C at 100 rpm, 28 d) with *Antrodia cinnamomea* has been reported (Ma *et al.*, 2014). Also, polysaccharide and triterpenoid extraction from citrus peels, including pomelo, lemon, orange, and grapefruit, using SCF (25 °C at 100 rpm, 28 d) with *A. cinnamomea*

was also demonstrated (Yang *et al.*, 2012). Xu and Zhu (2011), reported the extraction of phenolic compounds with antioxidant properties (DPPH[•] and hydroxyl scavenging activity) from ground corn stover by SCF (28 °C at 150 rpm, 12 d) using *Inonotus obliquus*. In addition, Vattem and Shetty (2002) demonstrated the extraction of phenolic compounds such as ellagic acid, resveratrol and rosmarinic acid with antioxidant properties (antiradical DPPH[•] and β-carotene antioxidant protection factor) from cranberry pomace by SSF (28 °C, 16 d) using *Rhizopus oligosporus*.

Additionally, table 3 compile literature reports focused on the extraction of phenolic compounds with antioxidant and antibacterial properties, from agro-industrial by-products using fungal fermentation-assisted extraction

Table 3. Obtaining phenolic compounds from agro-industrial by-products through fungal fermentation-assisted extraction.

Tabla 3. Obtención de compuestos fenólicos de subproductos agroindustriales mediante extracción-asistida por fermentación fúngica.

Substrate	Fungi	Fermentation	Relevant results	Reference
Black rice bran	<i>Aspergillus awamori</i> and <i>Aspergillus oryzae</i>	SSF	<p>'Fungal fermentation effect on phenolic compounds'</p> <ul style="list-style-type: none"> ▼ Total phenolic and anthocyanin content, in the order <i>A. awamori</i> > <i>A. oryzae</i> ▲ Total phenolic content obtained by decomposing anthocyanin content ▲ Protocatechuic, OH-benzoic, vanillic, caffeic, <i>p</i>-coumaric and ferulic acids <p>'Fungal fermentation effect on bioactivity'</p> <ul style="list-style-type: none"> ▲ DPPH[•] radical-scavenging activity 	Shin <i>et al.</i> (2019)
Peanut press cake	<i>Aspergillus awamori</i>	SSF	<p>'Fungal fermentation effect on phenolic compounds'</p> <ul style="list-style-type: none"> ▲ Total phenolic, flavonoid and tannin content <p>'Fungal fermentation effect on bioactivity'</p> <ul style="list-style-type: none"> ▲ ABTS^{•+} and DPPH[•] radical-scavenging activity ▲ Metal chelating activity 	Sadh <i>et al.</i> (2018)
Rice bran extract	<i>Aspergillus oryzae</i> and <i>Rhizopus oryzae</i>	SSF	<p>'Fungal fermentation effect on phenolic compounds'</p> <ul style="list-style-type: none"> ▲ Ferulic, caffeic, and protocatechuic acids, by <i>A. oryzae</i> ▲ Sinapic, vanillic, caffeic, syringic, protocatechuic, and 4-hydroxybenzoic acids, by <i>R. oryzae</i> <p>'Fungal fermentation effect on bioactivity'</p> <ul style="list-style-type: none"> ▲ FRAP, by both fungi ● DPPH[•] radical-scavenging activity 	Razak <i>et al.</i> (2017)
Corn cob, pea pod, rice straw, sugarcane bagasse, and wheat straw	<i>Aspergillus terreus</i> and <i>Penicillium citrinum</i>	SSF	<p>'Fungal fermentation effect on phenolic compounds'</p> <ul style="list-style-type: none"> ▲ Total phenolic content, by both fungi <p>'Fungal fermentation effect on bioactivity'</p> <ul style="list-style-type: none"> ▲ DPPH[•] and NO[•] radical-scavenging activity, by both fungi ▲ Fe²⁺ scavenging activity, by both fungi ▲ FRAP, by both fungi 	Chandra and Arora (2016)
Plum fruit	<i>Aspergillus niger</i> and <i>Rhizopus oligosporus</i>	SSF	<p>Plum pomace</p> <p>'Fungal fermentation effect on phenolic compounds'</p> <ul style="list-style-type: none"> ▲ Total phenolic and flavonoid content, in a similar manner for both fungi ▲ Chlorogenic acid, isoquercetin, and rutin ▼ neochlorogenic acid, isorhamnetin-3-galactoside, Isorha-3-gluc, isorhamnetin-3-glucoside, cyaniding-3-glucoside, and cyaniding-3-rutinoside ● Quercetin-3-galactoside <p>'Fungal fermentation effect on bioactivity'</p> <ul style="list-style-type: none"> ▲ DPPH[•] radical-scavenging activity, in a similar manner for both fungi <p>Waste from plum brandy production</p> <p>'Fungal fermentation effect on phenolic compounds'</p> <ul style="list-style-type: none"> ▲ Total phenolic and flavonoid content, in a similar manner for both fungi ▲ Neochlorogenic acid, chlorogenic acid, isoquercitrin, quercetin-3-galactoside, and rutin ▼ Isorhamnetin-3-galactoside ● Isorhamnetin-3-glucoside, and cyaniding-3-glucoside and cyaniding-3-rutinoside <p>'Fungal fermentation effect on bioactivity'</p> <ul style="list-style-type: none"> ▲ DPPH[•] radical-scavenging activity, in a similar manner for both fungi 	Dulf <i>et al.</i> (2016)

Substrate	Fungi	Fermentation	Relevant results	Reference
Apple pomace	<i>Rhizopus oryzae</i>	SSF and SCF	'Fungal fermentation effect on phenolic compounds' ▲ Fumaric acid production, by both culture methods	Das <i>et al.</i> (2015)
Orchid	<i>Fusarium avenaceum</i> and <i>Fusarium oxysporum</i>	SSF	'Fungal fermentation effect on phenolic compounds' ▲ Total phenolic content 'Fungal fermentation effect on bioactivity' ▲ DPPH [•] and ABTS ^{•+} radical-scavenging activity, as well as reducing power ▲ Inhibition of <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Bacillus subtilis</i> growth	Dong <i>et al.</i> (2015)
Peanut shell	<i>Inonotus obliquus</i>	SCF	'Fungal fermentation effect on phenolic compounds' ▲ Phenolic compounds such as epigallocatechin-3-gallate, epicatechin-3-gallate, phelligradin G, davallialactone, and inoscavin B ▼ Phenolic acid, including gallic and ferulic acids 'Fungal fermentation effect on bioactivity' ▲ DPPH [•] and [•] OH radical-scavenging activity	Xu <i>et al.</i> (2014)
Algae	<i>Candida utilis</i>	SCF	'Fungal fermentation effect on bioactivity' ▲ Inhibition of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	Eom <i>et al.</i> (2013)
Herbal residues	<i>Aspergillus oryzae</i>	SSF	'Fungal fermentation effect on phenolic compounds' ▲ Gallic acid formation 'Fungal fermentation effect on bioactivity' ▲ DPPH [•] radical-scavenging activity and reducing power ▲ Inhibition of <i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , and <i>Escherichia coli</i>	Wen <i>et al.</i> (2013)
Sugarcane bagasse	<i>Inonotus obliquus</i>	SCF	'Fungal fermentation effect on phenolic compounds' ▲ Phenolic compounds such as epicatechin-3-gallate, epigallocatechin-3-gallate, and phelligradin G 'Fungal fermentation effect on bioactivity' ▲ DPPH [•] and [•] OH radical-scavenging activity	Zhu and Xu (2013)
Coffee silver-skin and coffee grounds	<i>Aspergillus ustus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Neurospora crassa</i> , and <i>Penicillium purpurogenum</i>	SSF	'Fungal fermentation effect on phenolic compounds' ▲ Total phenolic content	Machado <i>et al.</i> (2012)
Pineapple and guava	<i>Rhizopus oligosporus</i>	SSF	'Fungal fermentation effect on phenolic compounds' ▲ Total phenolic content 'Fungal fermentation effect on bioactivity' ▼ DPPH [•] radical-scavenging activity	Sousa and Correia (2012)
Corn cob	<i>Yarrowia lipolytica</i>	SCF	'Fungal fermentation effect on phenolic compounds' ▲ Ferulic acid production	Huang <i>et al.</i> (2011)
Cashew husk	<i>Aspergillus oryzae</i>	SSF	'Fungal fermentation effect on phenolic compounds' ▲ Gallic acid production	Lokeshwari and Reddy (2010)
Citrus peel	<i>Cordyceps sinensis</i>	SCF	▲ Total phenolic and flavonoids content ▲ ABTS ^{•+} radical-scavenging activity	Choi <i>et al.</i> (2010)
Wheat bran	<i>Agrocybe chaxingu</i> , <i>Auricularia auricula-judae</i> , <i>Cordyceps militaris</i> , <i>Hericium erinaceus</i> , and <i>Pleurotus ostreatus</i>	SCF	'Fungal fermentation effect on phenolic compounds' ▲ Ferulic acid production, in the order <i>H. erinaceus</i> > <i>P. ostreatus</i> > <i>C. militaris</i>	Xie <i>et al.</i> 2010
Valonia acorns extract	<i>Aspergillus oryzae</i> and <i>Trichoderma reesei</i>	SCF	'Fungal fermentation effect on phenolic compounds' ▲ Ellagic acid production, in the order <i>A. oryzae</i> > <i>T. reesei</i>	Huang <i>et al.</i> (2007)
Shrimp and crab shell powder	<i>Monascus purpureus</i>	SCF	'Fungal fermentation effect on bioactivity' ▲ Antimicrobial effect against <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Escherichia coli</i>	Wang <i>et al.</i> (2002)
Tannic acid	<i>Aspergillus awamori</i>	SCF	'Fungal fermentation effect on phenolic compounds' ▲ Gallic acid production	Seth and Chand (2000)

(▲), significant increase with respect to the control group; (▼), significant reduction with respect to the control group; (●), without significant differences with respect to the control group.

(SSF and SCF). Mycelial growth during fungal fermentation depends on the nutrient supply (nitrogen, phosphorus and carbon) and any type of energy source or substrate, as well as substrate digestibility, which are essential for extraction of bioactive secondary metabolites (Hölker *et al.*, 2004).

Likewise, an increase in enzyme production (lipases, xylanase, pectinase, proteases, cellulolytic, and ligninolytic enzymes) during fungal fermentation has been demonstrated (Hölker *et al.*, 2004; Sadh *et al.*, 2018). The enzymatic hydrolysis produced during fungal fermentation increase the extraction of phenolic compounds, such as *p*-coumaric, caffeic, chlorogenic, ferulic, protocatechuic, sinapic, syringic, and vanillic acids, quercetin, and rutin. Also, improve antioxidant activity like antiradical (DPPH[•] and ABTS^{•+} activity), chelating metal properties, ferric reducing antioxidant power, and nitric oxide chelating properties. As well as antimicrobial activity by microbial growth and foodborne pathogens reduction (Hölker *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2015; Dulf *et al.*, 2016; Razak *et al.*, 2017; Sadh *et al.*, 2018; Shin *et al.*, 2019). Thus, the enzymatic hydrolysis produced during fungal fermentation appears to be an attractive strategy to extract phenolic compounds with potential uses as food additives (Papaspyridi *et al.*, 2012).

Phenolic Compounds as Possible Meat and Meat Product Additives

The NOM-213-SSA1-2002 define a 'food additive' as 'those substances, which added directly to food and beverages during their elaboration, provide or intensify aroma, color, and flavor, to improve stability and conservation'. Also, the FDA (2008) indicate that a 'Food Additive' is 'any substance that when use directly or indirectly, become a component or otherwise affect the characteristics of any food, including any substance intended for use in packaging, production, manufacturing, processing, preparation, treatment, transportation or storage of food; and including any source of radiation intended for such use'. The *Codex Alimentarius* (2017) defined it as 'any substance that, regardless of its nutritional value, is intentionally added to a food in controlled quantities for technological purposes'.

Moreover, in the meat and meat products industry, additives are widely employed for preservative purposes (i.e., as antioxidants and antimicrobials). An antioxidant additive, is defined as a 'substance added to foods to prevent the oxygen

present in the air from causing undesirable changes in flavor and color' (USDA, 2015). In another context, an antimicrobial additive, is defined as 'a substance that meets the definition of food additive and is used to control microorganisms such as bacteria, viruses, fungi, among others, in food or food contact items' (FDA, 2008).

The following is a list of additives commonly used in meat and meat products as preservatives are: α -tocopherol (E307), acetic acid (E260), ascorbic acid (E300), citric acid (E330), erythorbic acid (E315), fumaric acid (E297), lactic acid (E270), sorbic acid (E200), tartaric acid (E334), sodium ascorbate (E301), calcium ascorbate (E302), sodium benzoate (E211), butylhydroxyanisole (E320), and butylhydroxytoluene (E321). Also, calcium carbonate (E170i), sodium citrate (E330), potassium citrate (E332), tricalcium citrate (E333iii), trisodium citrate (E331iii), isopropyl citrate (E384), sodium diacetate (E262ii), sodium erythorbate (E316), ethyl lauroyl arginate (E243), propyl gallate (E310), nitrite/sodium nitrate (E250 and E252), tert-butylhydroquinone (E319), potassium sorbate (E202), among others (NOM-122-SSA1-1994; FDA, 2004; European Commission, 2014; FAO, 2018). The preservative compounds mentioned above have phenolic groups in their structure, which in phenolic compounds (phenolic acid and flavonoids) are widely associated with their antioxidant and antimicrobial activity (Sova, 2012).

Moreover, extensive research has demonstrated that lipid oxidation and microbial growth, are the main factors involved in the quality loss of raw and cooked meat products. These factors lead to the formation of some compounds that affect sensory attributes, including changes in texture, odor, flavor, and color, which consequently have an adverse effect on meat acceptability and meat purchase intention (Faustmant *et al.*, 2010; Aziz and Karboune, 2018). Therefore, there have been efforts to obtain antioxidant and antimicrobial compounds from natural sources, including agro-industrial by-products (Faustmant *et al.*, 2010; Jiang and Xiong, 2016).

Table 4 shows the possible uses of phenolic compounds, obtained by SSF and SCF using agro-industrial residues as substrate, including as meat and meat product additives. In this context, it has been demonstrated that phenolic compounds and flavonoids can preserve raw and cooked meat and meat products from different species (beef, camel, chicken, and pork), against undesirable changes caused by lipid oxidation and microbial growth during refrigerated

Table 4. Uses of phenolic compounds as additives for meat and meat products.

Tabla 4. Usos de compuestos fenólicos como aditivos para carne y productos cárnicos.

As an antioxidant additive			
Phenolic compounds	Conditions	Relevant results	References
Flavonoids: catechin	Product: Minced camel meat	▲ Inhibition of lipid oxidation (catechin 72.7%, as well as tannic 95.5%, caffeic 80%, and gallic acids 70% approximately)	Maqsoo <i>et al.</i> (2015)
Phenolic acids: tannic, caffeic, and gallic	Storage: 4 °C for 9 days Addition level: 200 ppm	▲ Red color, 1 point in sensory score for all phenolic compounds	
Phenolic acids: caffeic, <i>t</i> -cinnamic, <i>p</i> -coumaric, ferulic, gallic, <i>p</i> -hydroxybenzoic, gentisic, sinapic, and syringic	Product: Beef Storage: 4 °C for 6 days Addition level: 0.05 mmol/kg	▲ Inhibition of lipid oxidation precooked beef in the order sinapic acid > caffeic acid > ferulic acid > gentisic acid > syringic acid > <i>t</i> -cinnamic acid > <i>p</i> -coumaric acid > <i>p</i> -hydroxybenzoic acid	Brettonnet <i>et al.</i> (2010)

Phenolic compounds	Conditions	Relevant results	References
Flavonoids: quercetin and rutin	Product: beef patties Storage: 2 °C for 11 days Addition level: 1 and 5 mM	▼ L* values in concentration dependence (quercetin 1.9%; rutin 3.0%) ▼ C values in concentration dependence (quercetin 12.3%; rutin 16.6%) ▲ h values in concentration dependence (quercetin 8.9%; rutin 16.4%) ▲ Inhibition of metmyoglobin formation in concentration dependence (quercetin 47.0% approximately; rutin 66.0% approximately) ▲ Inhibition of lipid oxidation in concentration dependence (quercetin 14.3%) ▼ Inhibition of lipid oxidation (rutin -23.8%)	Bekhit <i>et al.</i> (2004)
Flavonoids: quercetin	Product: cook-chill chicken Storage: 5 °C for 5 days Addition level: 1.6% and 3.0%	▲ Inhibition of lipid oxidation (83.9% and 97.3% in concentration dependence)	Karastogiannidou (1999)
Flavonoids: (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin gallate (ECG), and (-)-epigallocatechin gallate (EGCG)	Product: ground white muscle of mackerel Storage: cooked at 75 °C, 4 °C for 7 days Addition level: EC and EGC (200 mg/kg). ECG and EGCG (300 mg/kg)	▲ Inhibition of lipid oxidation (EC 40.5%; EGC, ECG, and EGCG 65.5%)	He and Shahidi (1997)
Flavonoids: kaempferol, morin, myricetin, naringenin, naringin, quercetin, and rutin Phenolic acids: gallic, caffeic, coumaric, ferulic, syringic, vanillic, sinapic, chlorogenic, and tannic	Product: cooked ground pork Storage: 4 °C for 4 weeks Addition level: 30 and 200 ppm	▲ Inhibition of lipid oxidation in concentration dependence Kaempferol (95.3%), morin (96.4%), myricetin (98.7%), naringenin (3.3%), naringin (2.3%), quercetin (98.9%), rutin (33.0%), as well as gallic (73.5%), caffeic (69.3%), coumaric (54.3%), ferulic (56.6%), syringic (55.3%), vanillic (23.6%), sinapic (38.5%), chlorogenic (35.0%), and tannic (98.9%) acids	Shahidi <i>et al.</i> (1993)
Flavonoids: kaempferol, morin, myricetin, naringenin, naringin, quercetin, and rutin Phenolic acids: ellagic, gallic, vanillic, syringic, and tannic	Product: pork model system, cooked at 75 °C Storage: 4 °C for 3 weeks Addition level: 200 ppm	▲ Inhibition of lipid oxidation Kaempferol (41%), morin (30%), myricetin (1.0%), naringenin (4.7%), naringin (4.7%), quercetin (97%), and rutin (28.4%), as well as ellagic (99.0%), gallic (44.7%), vanillic (21.3%), syringic (39.6%), and tannic (57.0%) acids	Shahidi <i>et al.</i> (1992)
As an antimicrobial additive			
Phenolic compounds	Conditions	Relevant results	References
Flavonoids: catechin Phenolic acids: tannic, caffeic, and gallic	Product: Minced camel meat Storage: 4 °C for 9 days Addition level: 200 ppm	▲ Inhibition of mesophilic bacteria count, 1 log approximately (catechin and tannic acids) ▲ Inhibition of psychrotrophic bacteria count, 1 log approximately (catechin, tannic, and gallic acids)	Maqsoo <i>et al.</i> (2015)
Flavonoids: rutin Phenolic acids: caffeic acid and <i>p</i> -coumaric	Product: chicken soup Storage: 4 and 25 °C for 48 h Addition level: 0.2 mg/mL	▲ Inhibition of <i>Staphylococcus aureus</i> growth (100% by all phenolic compounds)	Stojković <i>et al.</i> (2013)
Phenolic acids: benzoic	Product: Raw and cooked chicken meat Storage: 4 and 20 °C for 14 days Addition level: 5000 ppm	▲ Inhibition of <i>Listeria monocytogenes</i> and growth in raw and cooked meat (1.2 and 3.5 log, respectively) ▲ Inhibition of <i>Salmonella typhimurium</i> and growth in raw and cooked meat (1.2 log by both)	Ravichandran <i>et al.</i> (2011)
Flavonoids: Mixture of quercetin and rutin Phenolic acids: Mixture of gallic and caffeic Mixture of gallic and protocatechuic	Product: meat model system Storage: 4 °C for 24 h days Addition level: 100 and 200 mg	▲ Inhibition of <i>Listeria monocytogenes</i> growth in concentration dependence (mixture quercetin and rutin 6.7 log; mixture gallic and caffeic acids 6.3 log; mixture gallic and protocatechuic acids 3.7 log)	Rodríguez-Vaquero <i>et al.</i> (2011)
Phenolic acids: carvacrol and thymol	Product: bovine meat stake Storage: 7 °C for 96 h Addition level: <1 µL/mL	▲ Inhibition of <i>Staphylococcus aureus</i> growth of carvacrol and thymol in combination with organic acids (lactic and acetic)	De Oliveira <i>et al.</i> (2010)
Flavonoids: Mixture of quercetin and rutin Phenolic acids: Mixture of gallic and caffeic Mixture of gallic and protocatechuic	Product: meat model system Storage: 20 °C for 14 days Addition level: 100 and 200 mg	▲ Concentration- and temperature-dependent inhibition of <i>Escherichia coli</i> growth (mixture of quercetin and rutin 100%; mixture of gallic and caffeic acids 100%; mixture of gallic and protocatechuic acids 50% approximately)	Rodríguez-Vaquero <i>et al.</i> (2010)

(▲), significant increase with respect to the control group; (▼), significant reduction with respect to the control group.

storage (Stojković *et al.*, 2013; Maqsoo *et al.*, 2015). Furthermore, phenolic compounds can act through two pathways: (1) by breaking chain reactions triggered by free radicals, which implies hydrogen atom transfer (HAT), then electron transfer followed by a proton transfer mechanism (SET-PT) and sequential proton-loss electron-transfer (SPLET), and (2) by reducing metals such as copper (Cu^{2+}) and iron (Fe^{3+}) (Marković *et al.*, 2012). Additionally, phenolic compounds can act against nucleic acid and protein synthesis and alter the components of cellular membranes (Cushnie and Lamb, 2005).

CONCLUSION

The agro-industrial by-products are an important source of phenolic compounds, including phenolic acids and flavonoids. The uses of agro-industrial residues as substrates (seeds, pulps, and peels) during fungal fermentation-assisted extraction (SSF and SCF), can be used as an alternative or complementary strategy to obtain phenolic compounds like rustic, conventional and unconventional extraction methods. These compounds could be use as antioxidant and antimicrobial additives to extend the shelf life of raw and cooked meat and meat products from different species (beef, camel, chicken, and pork) during refrigerated storage.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge Cátedras CONACYT for the fellowship of the project (#739).

REFERENCES

- Aziz, M. and Karboune, S. 2018. Natural antimicrobial/antioxidant agents in meat and poultry products as well as fruits and vegetables: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 58: 486-511.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A. and Omar, A.K.M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. 117: 426-436.
- Balasuriya, N. and Rupasinghe, H.V. 2012. Antihypertensive properties of flavonoid-rich apple peel extract. *Food Chemistry*. 135: 2320-2325.
- Bekhit, A.E.D., Geesink, G.H., Ilian, M.A., Morton, J.D., Sedcole, J.R. and Bickerstaffe, R. 2004. Pro-oxidant activities of carnosine, rutin and quercetin in a beef model system and their effects on the metmyoglobin-reducing activity. *European Food Research and Technology*. 218: 507-514.
- Brettonnet, A., Hewavitarana, A., DeJong, S. and Lanari, M.C. 2010. Phenolic acids composition and antioxidant activity of canola extracts in cooked beef, chicken, and pork. *Food Chemistry*. 121: 927-933.
- Castañeda-Casasola, C., Arana-Cuenca, A., Favela-Torres, E., Anducho-Reyes, M.A., González, A.E. and Téllez-Jurado, A. 2018. Xylanase enzymes production by *Aspergillus fumigatus* in solid state fermentation and submerge fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 17: 47-61.
- Chandra, P. and Arora, D.S. 2016. Production of antioxidant bioactive phenolic compounds by solid-state fermentation on agro-residues using various fungi isolated from soil. *Asian Journal of Biotechnology*. 8: 8-15.
- Choi, J.W., Ra, K.S., Kim, S.Y., Yoon, T.J., Yu, K.W., Shin, K.S., Lee, S.P. and Suh, H.J. 2010. Enhancement of anti-complementary and radical scavenging activities in the submerged culture of *Cordyceps sinensis* by addition of citrus peel. *Bioresource Technology*. 101: 6028-6034.
- Comisión del Codex Alimentarius, Normas internacionales de los alimentos; Norma general para los aditivos alimentarios [Accesses 2 march 2020] 2017. Available in: http://www.fao.org/gsfaonline/docs/CXS_192s.pdf. (Fecha de consulta, Septiembre de 2019).
- Cushnie, T.P.T. and Lamb, A.J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26: 343-356.
- Das, R.K., Brar, S.K. and Verma, M. 2015. A fermentative approach towards optimizing directed biosynthesis of fumaric acid by *Rhizopus oryzae* 1526 utilizing apple industry waste biomass. *Fungal Biology*. 119: 1279-1290.
- De Oliveira, C.E.V., Stamford, T.L.M., Neto, N.J.G. and de Souza, E.L. 2010. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. *International Journal of Food Microbiology*. 137: 312-316.
- Dey, T.B., Chakraborty, S., Jain, K.K., Sharma, A. and Kuhad, R.C. 2016. Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid-state fermentation process: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 53: 60-74.
- Dong, J.W., Cai, L., Xiong, J., Chen, X.H., Wang, W.Y., Shen, N., Liu, B.L. and Ding, Z.T. 2015. Improving the antioxidant and antibacterial activities of fermented *Bletilla striata* with *Fusarium avenaceum* and *Fusarium oxysporum*. *Process Biochemistry*. 50: 8-13.
- Dulf, F.V., Vodnar, D.C. and Socaciu, C. 2016. Effects of solid-state fermentation with two filamentous fungi on the total phenolic contents, flavonoids, antioxidant activities and lipid fractions of plum fruit (*Prunus domestica* L.) by-products. *Food Chemistry*. 209: 27-36.
- Eom, S.H., Lee, D.S., Kang, Y.M., Son, K.T., Jeon, Y.J. and Kim, Y.M. 2013. Application of yeast *Candida utilis* to ferment *Eisenia bicyclis* for enhanced antibacterial effect. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 171: 569-582.
- European Commission (EC), Guidance document describing the food categories in Part E of Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 on Food Additives [Accesses 2 march 2020] 2014. Available in: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/fs_food-improvement-agents_guidance_1333-2008_annex2.pdf
- Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R. and Suman, S.P. 2010. Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat science*. 86: 86-94.
- Food and Drug Administration (FDA), Overview of food ingredients, additives & colors [Accesses 2 march 2020] 2004. Available in: <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/overview-food-ingredients-additives-colors>
- Food and Drug Administration (FDA), Microbiological considerations for antimicrobial food additive submissions [Accesses 2 march 2020] 2008. Available in: <https://www.fda.gov/media/83078/download>

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), The future of food and agriculture, trends and challenges [Accesses 2 march 2020] 2017. Available in: <http://www.fao.org/3/a-i6583e.pdf>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), *Codex alimentarius*, norma general para los aditivos alimentarios [Accesses 2 march 2020] 2018. Available: http://www.fao.org/gsfaonline/docs/CXS_192s.pdf
- Hammad, H.H.M., Jin, G., Ma, M., Khalifa, I., Shukat, R., Elkhedir, A.E., Zeng, Q. and Noman, A.E. 2020. Comparative characterization of proximate nutritional compositions, microbial quality, and safety of camel meat in relation to mutton, beef, and chicken. *LWT-Food Science and Technology*. 118: 108714.
- He, Y. and Shahidi, F. 1997. Antioxidant activity of green tea and its catechins in a fish meat model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45: 4262-4266.
- Hernández-Carlos, B., Santos-Sánchez, N.F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C. and Guadarrama-Mendoza, P.C. 2019. Antioxidant compounds from agro-industrial residue. In *Antioxidants*. IntechOpen (Ed). DOI: 10.5772/intechopen.85184.
- Hölker, U., Höfer, M. and Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 175-186.
- Huang, W., Niu, H., Li, Z., Lin, W., Gong, G. and Wang, W. 2007. Effect of ellagitannin acyl hydrolase, xylanase and cellulase on ellagic acid production from cups extract of valonia acorns. *Process Biochemistry*. 42: 1291-1295.
- Huang, Y.C., Chen, Y.F., Chen, C.Y., Chen, W.L., Ciou, Y.P., Liu, W.H. and Yang, C.H. 2011. Production of ferulic acid from lignocellulolytic agricultural biomass by *Thermobifida fusca* thermostable esterase produced in *Yarrowia lipolytica* transformant. *Bioresource Technology*. 102: 8117-8122.
- Jiang, J. and Xiong, Y.L. 2016. Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. *Meat Science*. 120: 107-117.
- Karastogiannidou, C. 1999. Effects of onion quercetin on oxidative stability of cook-chill chicken in vacuum-sealed containers. *Journal of Food Science*. 64: 978-981.
- Łata, B., Trampczynska, A. and Paczesna, J. 2009. Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Scientia Horticulturae*. 121: 176-181.
- Lokeshwari, N. and Reddy, S. 2010. Microbiological production of gallic acid by a mutant strain of *Aspergillus oryzae* using cashew husk. *Pharmacophore*. 1: 112-122.
- Ma, T.W., Lai, Y. and Yang, F.C. 2014. Enhanced production of triterpenoid in submerged cultures of *Antrodia cinnamomea* with the addition of citrus peel extract. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 37: 2251-2261.
- Machado, E.M., Rodriguez-Jasso, R.M., Teixeira, J.A. and Mussatto, S.I. 2012. Growth of fungal strains on coffee industry residues with removal of polyphenolic compounds. *Biochemical Engineering Journal*. 60: 87-90.
- Maqsood, S., Abushelaibi, A., Manheem, K., Al Rashedi, A. and Kadim, I.T. 2015. Lipid oxidation, protein degradation, microbial and sensorial quality of camel meat as influenced by phenolic compounds. *LWT-Food Science and Technology*. 63: 953-959.
- Marković, Z., Milenković, D., Đorović, J., Marković, J.M.D., Stepanić, V., Lučić, B. and Amić, D. 2012. PM6 and DFT study of free radical scavenging activity of morin. *Food Chemistry*. 134: 1754-1760
- Moulehi, I., Bourgou, S., Ourghemmi, I. and Tounsi, M.S. 2012. Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. *Industrial Crops and Products*. 39: 74-80.
- Norma Oficial Mexicana NOM-122-SSA1-1994 (NOM), Bienes y servicios. Productos de la carne. Productos cárnicos curados y cocidos, y curados emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias [Accesses 2 march 2020] 1994. Available in: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/122ssa14.html>
- Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009 (NOM). Prácticas de higiene para el procesamiento de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios [Accesses 2 march 2020] 2009. Available in: <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/3980/salud/salud.htm>
- Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002 (NOM), Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba [Accesses 2 march 2020] 2002. Available in: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/213ssa102.html>
- Onyeneho, S.N. and Hettiarachchy, N S. 1993. Antioxidant activity, fatty acids and phenolic acids compositions of potato peels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 62: 345-350.
- Orphanides, A., Goulas, V. and Gekas, V. 2013. Effect of drying method on the phenolic content and antioxidant capacity of spearmint. *Czech Journal of Food Sciences*. 31: 509-513.
- Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 81-84.
- Papaspyridi, L.M., Aligiannis, N., Topakas, E., Christakopoulos, P., Skaltsounis, A.L. and Fokialakis, N. 2012. Submerged fermentation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* in a batch stirred tank bioreactor as a promising alternative for the effective production of bioactive metabolites. *Molecules*. 17: 2714-2724.
- Peanparkdee, M. and Iwamoto, S. 2019. Bioactive compounds from by-products of rice cultivation and rice processing: Extraction and application in the food and pharmaceutical industries. *Trends in Food Science & Technology*. 86: 109-117.
- Pinelo, M., Tress, A.G., Pedersen, M., Arnous, A. and Meyer, A.S. 2007. Effect of cellulases, solvent type and particle size distribution on the extraction of chlorogenic acid and other phenols from spent coffee grounds. *American Journal of Food and Technology*. 2: 641-651.
- Poljsak, B., Šuput, D. and Milisav, I. 2013. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative medicine and Cellular Longevity*. 1: 1-11.
- Pronyk, C. and Mazza, G. 2009. Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and bioproducts. *Journal of Food Engineering*. 95: 215-226.
- Quirós-Sauceda, A. E., Palafox, H., Robles-Sánchez, R. M. and González-Aguilar, G. A. 2011. Interacción de compuestos fenólicos y fibra dietaria: capacidad antioxidante y biodisponibilidad. *Biocencia*. 13: 3-11.

- Ramírez-Rojo, M.I., Vargas-Sánchez, R.D., del Mar Torres-Martínez, B., Torrescano-Urrutia, G.R. and Sánchez-Escalante, A. 2018. Extractos de hojas de plantas para conservar la calidad de la carne y los productos cárnicos frescos. Revisión. *Biotecnia*. 20: 155-164.
- Ravichandran, M., Hettiarachchy, N.S., Ganesh, V., Ricke, S.C. and Singh, S. 2011. Enhancement of antimicrobial activities of naturally occurring phenolic compounds by nanoscale delivery against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhimurium* in broth and chicken meat system. *Journal of Food Safety*. 31: 462-471.
- Razak, D.L.A., Rashid, N.Y.A., Jamaluddin, A., Sharifudin, S.A., Kahar, A.A. and Long, K. 2017. Cosmeceutical potentials and bioactive compounds of rice bran fermented with single and mix culture of *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae*. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 16: 127-134.
- Rico, X., Gullón, B., Alonso, J.L. and Yáñez, R. 2020. Recovery of high value-added compounds from pineapple, melon, watermelon, and pumpkin processing by-products: an overview. *Food Research International*. 109086.
- Rodríguez-Carpena, J.G., Morcuende, D., Andrade, M.J., Kylli, P. and Estévez, M. 2011. Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 5625-5635.
- Rodríguez Vaquero, M.J., Aredes Fernandez, P.A., Manca de Nadra, M.C. and Strasser de Saad, A.M. 2010. Phenolic compound combinations on *Escherichia coli* viability in a meat system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 6048-6052.
- Rodríguez Vaquero, M.J., Aredes Fernández, P.A., de Nadra, M. and Cristina, M. 2011. Effect of phenolic compound mixtures on the viability of *Listeria monocytogenes* in meat model. *Food Technology and Biotechnology*. 49: 83-88.
- Sadh, P.K., Chawla, P. and Duhan, J.S. 2018. Fermentation approach on phenolic, antioxidants and functional properties of peanut press cake. *Food Bioscience*. 22: 113-120.
- Santana-Méridas, O., González-Coloma, A. and Sánchez-Vioque, R. 2012. Agricultural residues as a source of bioactive natural products. *Phytochemistry Reviews*. 11: 447-466.
- Seth, M. and Chand, S. 2000. Biosynthesis of tannase and hydrolysis of tannins to gallic acid by *Aspergillus awamori*-optimisation of process parameters. *Process Biochemistry*. 36: 39-44.
- Shahidi, F., Wanasundara, P.K.J.P.D. and Hong, C. 1992. Antioxidant activity of phenolic compounds in meat model systems. In: Phenolic compounds in foods and their effects on health. Ho, C.-T., Lee, C.Y. and Huang, M.-T. (Eds.). ACS Symposium Series 506, American Chemical Society, Washington, DC. pp. 214-222.
- Shahidi, F., Yang, Z. and Saleemi, Z.O. 1993. Stabilization of meat lipids with flavonoids and flavonoid-related compounds. *Journal of Food Lipids*. 1: 69-78.
- Shin, H.Y., Kim, S.M., Lee, J.H. and Lim, S.T. 2019. Solid-state fermentation of black rice bran with *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae*: effects on phenolic acid composition and antioxidant activity of bran extracts. *Food Chemistry*. 272: 235-241.
- Sousa, B.A. and Correia, R.T.P. 2012. Phenolic content, antioxidant activity and anti-amylolytic activity of extracts obtained from bioprocessed pineapple and guava wastes. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 29: 25-30.
- Spigno, G., Tramelli, L. and De Faveri, D.M. 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*. 81: 200-208.
- Sova, M. 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 12: 749-767.
- Stojković, D., Petrović, J., Soković, M., Glamočlija, J., Kukić-Marković, J. and Petrović, S. 2013. *In situ* antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, *p*-coumaric acid and rutin, using food systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93: 3205-3208.
- United States Department of Agriculture (USDA), Additives in Meat and Meat Products [Accesses 2 march 2020] 2015. Available in: <https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/ffsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/food-labeling/additives-in-meat-and-poultry-products/additives-in-meat-and-poultry-products>
- Valdez-Morales, M., Espinosa-Alonso, L.G., Espinoza-Torres, L.C., Delgado-Vargas, F. and Medina-Godoy, S. 2014. Phenolic content and antioxidant and antimutagenic activities in tomato peel, seeds, and by-products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62: 5281-5289.
- Vattem, D.A. and Shetty, K. 2002. Solid-state production of phenolic antioxidants from cranberry pomace by *Rhizopus oligosporus*. *Food Biotechnology*. 16: 189-210.
- Vermeris, W. and Nicholson, R. 2008. Families of phenolic compounds and means of classification. In: Phenolic compound biochemistry. Springer (ed.), pp 1-34. Switzerland AG.
- Wang, S.L., Hsiao, W.J. and Chang, W.T. 2002. Purification and characterization of an antimicrobial chitinase extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCRC31499 in a shrimp and crab shell powder medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 2249-2255.
- Wen, Y.L., Yan, L.P. and Chen, C.S. 2013. Effects of fermentation treatment on antioxidant and antimicrobial activities of four common Chinese herbal medicinal residues by *Aspergillus oryzae*. *Journal of Food and Drug Analysis*. 21: 219-226.
- Wijngaard, H., Hossain, M.B., Rai, D.K. and Brunton, N. 2012. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Research International*. 46: 505-513.
- Xie, C.Y., Gu, Z.X., You, X., Liu, G., Tan, Y. and Zhang, H. 2010. Screening of edible mushrooms for release of ferulic acid from wheat bran by fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 46: 125-128.
- Xu, X. and Zhu, J. 2011. Enhanced phenolic antioxidants production in submerged cultures of *Inonotus obliquus* in a ground corn stover medium. *Biochemical Engineering Journal* 58: 103-109.
- Xu, X.Q., Hu, Y. and Zhu, L.H. 2014. The capability of *Inonotus obliquus* for lignocellulosic biomass degradation in peanut shell and for simultaneous production of bioactive polysaccharides and polyphenols in submerged fermentation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 45: 2851-2858.

- Xu, X., Shen, M. and Quan, L. 2015. Stimulatory agents simultaneously improving the production and antioxidant activity of polyphenols from *Inonotus obliquus* by submerged fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 176: 1237-1250.
- Yang, F.C. and Liao, C. B. 1998. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Process Biochemistry*. 33: 547-553.
- Yang, F.C., Ma, T.W. and Chuang, Y.T. 2012. Medium modification to enhance the formation of bioactive metabolites in shake flask cultures of *Antrodia cinnamomea* by adding citrus peel extract. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 35: 1251-1258.
- Zhu, L. and Xu, X. 2013. Stimulatory effect of different lignocellulosic materials for phenolic compound production and antioxidant activity from *Inonotus obliquus* in submerged fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 169: 2138-2152.



Efecto de levaduras de origen marino y ulvan en el control poscosecha de *Penicillium italicum* agente causal del moho azul en limón persa

Effect of marine yeasts and ulvan on the postharvest control of *Penicillium italicum* causal agent of blue mold in Persian lemon

María Luisa Vázquez-Vázquez¹, Roberto Gregorio Chiquito-Contreras¹, Gabriela Sanchez-Viveros¹, Juan José Reyes-Pérez², María de Jesús Martínez-Hernández¹, Luis Guillermo Hernández-Montiel^{3*}

¹ Facultad de Ciencias Agrícolas. Campus Xalapa. Universidad Veracruzana. Circuito Universitario Gonzalo Aguirre Beltrán S/N. Zona Universitaria. 91090. Xalapa, Veracruz, México.

² Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Av. Quito. km 1.5. Vía a Santo Domingo. Quevedo, Los Ríos, Ecuador.

³ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Av. Instituto Politécnico Nacional 195. Col. Playa Palo de Santa Rita Sur. 23096. La Paz, Baja California Sur, México.

RESUMEN

Penicillium italicum es un hongo que causa el moho azul en los cítricos. Su control es con fungicidas sintéticos, sin embargo, levaduras de origen marino y ulvan son una alternativa a los agro-productos sintéticos. El objetivo del estudio fue determinar el antagonismo *in vitro* de levaduras hacia *P. italicum* y su efecto con ulvan en el control del moho azul en frutos de limón persa. Se evaluó el efecto de ulvan sobre *P. italicum* y levaduras, para esto se determinó el antagonismo *in vitro* por confrontación entre levadura-fitopatógeno y competencia por carbohidratos. Se evaluó la protección de frutos con levaduras y ulvan hacia *P. italicum* y se determinó severidad e incidencia de la enfermedad y expresión de SOD, POX y CAT. No hubo efecto de ulvan sobre los microorganismos. *In vitro* las levaduras inhibieron al fitopatógeno. Los carbohidratos disminuyeron con levaduras y *P. italicum* y se inhibió la germinación de esporas del fitopatógeno. La incidencia de *P. italicum* en los frutos fue disminuida por levaduras y ulvan. POX, CAT y SOD se incrementó en los frutos con levaduras y ulvan. La aplicación de levaduras de origen marino más ulvan puede ser una opción en el control del moho azul en frutos de limón persa.

Palabras clave: Mecanismos antagónicos; control biológico; frutos; enzimas de defensa.

ABSTRACT

Penicillium italicum is a fungus that cause the blue mold on citrus fruits. Its control is with synthetic fungicides, however, marine yeasts and ulvan are an alternative to synthetic agro-products. The objective of this study was to determine *in vitro* antagonism of yeasts against *P. italicum* and its effect with ulvan in the control of blue mold in Persian lemon fruits. The effect of ulvan on *P. italicum* and yeasts was evaluated, for this *in vitro* antagonism was determined by confrontation between yeast-phytopathogen and competition for carbohydrates. The protection of fruits with yeasts and ulvan against *P. italicum* was evaluated and the severity and incidence of the disease and the expression of SOD, POX and CAT were determined. There was no effect of ulvan on microorganisms. *In vitro*, yeasts inhibited the phytopatho-

gen. Carbohydrates decreased with yeast and *P. italicum*, and spore germination of the phytopathogen was inhibited. The incidence of *P. italicum* in the fruits was decreased by yeast and ulvan. POX, CAT and SOD increased in fruits with yeast and ulvan. The application of marine yeasts and ulvan may be an option for the control of blue mold in Persian lemon fruits.

Keyword: Antagonistic mechanisms; biological control; fruit; defense enzymes.

INTRODUCCIÓN

El limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka), es un cítrico comercializado por su alto contenido de vitamina C y aceites esenciales (Pérez-Nájera *et al.*, 2013; Fathollahi *et al.*, 2021). México ocupa el primer lugar a nivel mundial en la producción de limón (FAO, 2019). Sin embargo, existen pérdidas en poscosecha cercana al 50 % de la producción debido a hongos fitopatógenos. El hongo *Penicillium italicum*, es el agente causal del moho azul en los cítricos, afectado drásticamente la calidad del fruto y vida de anaquel (Jing *et al.*, 2020). Los fungicidas sintéticos son los productos más utilizados convencionalmente para el control de *P. italicum* en poscosecha de cítricos (Chen *et al.*, 2020). Sin embargo, han resultado ser ineficientes debido a que favorecen el desarrollo de fitopatógenos resistentes, además de presentar efectos negativos a la salud humana, animal y ambiental (Leyva-Acuña *et al.*, 2020; Ons *et al.*, 2020).

En la actualidad, la aplicación de microorganismos antagónicos como agentes de control biológico hacia fitopatógenos es una alternativa al uso de agro-productos sintéticos (Sui *et al.*, 2020; Cerna-Chávez *et al.*, 2021; Sánchez-Espinosa *et al.*, 2021). Las levaduras aisladas de planta, suelo o fruto han sido eficientes en el control de enfermedades en poscosecha, sin embargo, existen levaduras aisladas de ambientes marinos, las cuales, han demostrado tener mayor capacidad antagónica que las aisladas de ambientes terrestres e incluso de fungicidas sintéticos (Rivas-García *et al.*, 2018). Dentro de los mecanismos antagónicos de levaduras hacia los fitopatógenos están; competencia por espacio y nutrientes, producción de enzimas hidrolíticas, compuestos orgánicos

*Autor para correspondencia: Luis Guillermo Hernández Montiel
 Correo electrónico: lhernandez@cibnor.mx

Recibido: 01 de febrero de 2021

Aceptado: 11 de mayo de 2021

volátiles, inducción de resistencia en el hospedero, entre otros (Mukherjee *et al.*, 2020). Generalmente, se determina la capacidad antagonista de una levadura sobre frutos infectados por un fitopatógeno, sin embargo, en la actualidad, los consorcios microbianos han mostrado una mayor capacidad de inhibición debido a que se potencializan sus mecanismos de acción, además de incrementar su adaptación al hospedero (Palmieri *et al.*, 2017).

Por otra parte, el alga verde marina *Ulva* sp. por la actividad de sus polisacáridos ha sido estudiada como antioxidante, antibacteriano, larvicida, anticoagulante, promotora del crecimiento vegetal, inductor de resistencia en el hospedero, entre otros (Li *et al.*, 2020). El polisacárido ulvan protege a las plantas debido a su capacidad de inducir la resistencia sistémica adquirida, aumentando diversos compuestos como peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa, proteínas relacionadas con la patogénia (PR), entre otros, las cuales, le confieren una mayor tolerancia al hospedero hacia la infección por fitopatógenos (Abouraicha *et al.*, 2015).

La aplicación de microorganismos antagonistas más el polisacárido ulvan ha sido evaluado en el control de enfermedades en frutos (Rivas-García *et al.*, 2018; Chiquito-Contreras *et al.*, 2019), sin embargo, el efecto de levaduras de origen marino y ulvan no ha sido evaluado en el control de *P. italicum* en frutos de limón persa, lo cual, podría potenciar el control del moho azul, disminuyendo el uso de fungicidas sintéticos. Por lo anterior, en este estudio se determinó la capacidad antagonista *in vitro* de levaduras de origen marino hacia *P. italicum* y su efecto con ulvan en el control del moho azul sobre frutos de limón persa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Levaduras de origen marino

Las levaduras de origen marino fueron donadas por la colección de microorganismos perteneciente al CIBNOR y están identificadas como: *Debaryomyces hansenii* (cepa ECP4 y L1), *Cryptococcus laurentii* (cepa IRIICB) y *Rhodotorula minuta* (cepa IR4CF). Cada levadura se cultivó en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA, Difco™) a 25 °C por 48 h. Posteriormente, se colectó la biomasa y con una solución salina (0.85%) se ajustó su concentración a 1×10^6 células·mL⁻¹ con ayuda de un hematocitómetro.

Polisacárido ulvan

Ulvan (#ULV010, OligoTech®, Elicityl Ltd., Crolles, Francia) se preparó a 2 mg·mL⁻¹ usando agua desionizada estéril.

Muestreo

Se colectaron frutos de limón persa de una empacadora del Municipio de Martínez de la Torre, Veracruz, México, con signos y síntomas de moho azul, y se etiquetaron para su posterior procesamiento.

Aislamiento y patogenicidad de hongos poscosecha

Se cortaron cuatro trozos del exocarpo (de 0.5 cm²) enfermo de cada fruto. Las muestras se lavaron con hipoclorito de sodio al 5 % por 3 min y después se hicieron dos lavados con agua destilada estéril. Los trozos se dejaron secar y se colocaron en placas con PDA más Bactrol® al 0.05 % y se incubaron a 28 °C por 7 días. Los aislamientos fueron resembrados hasta obtener cultivos puros y se mantuvieron en placas con PDA y tubos inclinados a 4 °C.

Para la prueba de patogenicidad se usó la metodología de Navarta *et al.* (2014). Frutos de limón persa fueron sumergidos en hipoclorito de sodio al 5 % por 3 min, se enjuagaron en agua destilada estéril y secados en una campana de flujo laminar. Posteriormente, a cada fruto se le realizaron dos heridas de 2 mm con un bisturí estéril y se inoculó cada herida con un taquete 0.5 cm² de diámetro proveniente de un cultivo en PDA de 7 días de cada aislamiento de *Penicillium* sp. Un grupo de frutos fue inoculado con agua destilada estéril como control. Los frutos se almacenaron a 27 °C y 90 % HR en recipientes de plástico estériles por 7 días. Se cuantificó diámetro de lesión (mm) y la incidencia de la enfermedad (%DI) (Saravanakumar *et al.*, 2016), mediante la fórmula: %DI = FI/TF × 100. Donde: FI, es el número de frutos infectados y TF, es el total de frutos. Para confirmar los postulados de Koch cada hongo fue re-aislado de los frutos en placas con PDA. Se utilizaron 10 frutos por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

Identificación morfológica y molecular de hongos poscosecha

Los hongos fitopatógenos fueron identificados a través de sus características morfológicas utilizando claves taxonómicas (Agrios, 2005) y por técnicas moleculares utilizando la región ITS1-5,8s-ITS-2 del ADN.

Efecto de ulvan sobre el crecimiento de levaduras de origen marino y *Penicillium italicum*

Fue seleccionada la cepa C2T de *P. italicum* por ser la más patogénica y se cultivó en placas con PDA a 25 °C por 7 días. Las esporas se cosecharon en una solución salina al 0.85 % con Tween 80, ajustando su concentración a 1×10^4 esporas·mL⁻¹ con ayuda de un hematocitómetro (Tian *et al.*, 2002).

Efecto de ulvan sobre el crecimiento de levaduras de origen marino y *P. italicum*

Matraces Erlenmeyer que contenían 50 mL de medio YPD se inocularon con 1 mL de la suspensión ajustada previamente de cada levadura y 2 µL de ulvan. Los matraces se incubaron a 25 °C y 125 rpm. Se recolectaron alícuotas de 10 µL a las 6, 12, 18, 24 y 30 h para determinar el crecimiento de las levaduras de origen marino, con y sin, ulvan utilizando un espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 620 nm. Se realizaron lecturas por triplicado por tratamiento en cada intervalo de tiempo y el experimento se repitió dos veces.

Para *P. italicum*, matraces Erlenmeyer que contenían 50 mL de medio de cultivo Caldo Papa y Dextrosa (Difco, Detroit, USA), se inocularon con 1 mL de la suspensión ajustada previamente del hongo y 2 µL de ulvan. Los matraces se

incubaron a 25 °C y 125 rpm. Se colectaron alícuotas de 10 µL cada 6, 12, 18 y 24 h, colocándolas en un portaobjetos para ser observadas en un microscopio óptico. Se determinó la germinación de esporas, contabilizando 100 esporas y considerando una espora germinada, cuando el tubo germinativo fue igual o mayor al tamaño de la espora. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

Antagonismo *in vitro* de levaduras de origen marino hacia *P. italicum*

Los ensayos de confrontación antagonista-fitopatógeno se llevaron a cabo en placas con PDA. Se estría una línea de 4 cm de cada levadura y la combinación de ellas en el centro de la placa, posteriormente a 2 cm de distancia se colocó una alícuota de 20 µL de la suspensión ajustada del fitopatógeno (1×10^4 esporas·mL⁻¹). Un grupo de placas se inoculó con el fitopatógeno y 30 µL de un fungicida sintético (Benomyl 50°, a una concentración de 1000 ppm) y otro grupo solo fue inoculado con *P. italicum* (tratamiento control). Las placas fueron incubadas a 25 °C por 7 días. Se cuantificó el diámetro de crecimiento (mm) del fitopatógeno y se calculó la reducción del crecimiento micelial con la fórmula I (%) = $DC-DT/DC \times 100$. Donde: DC, es el micelio cuantificado en el tratamiento control y DT, es el diámetro del hongo en el tratamiento con levaduras de origen marino. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

Competencia *in vitro* por nutrimentos entre levaduras de origen marino y *P. italicum*

Medio de cultivo a base de flavedo de limón persa

El medio de cultivo se elaboró utilizando frutos de limón persa previamente lavados con agua del grifo, agua destilada y pelados con un bisturí estéril. Para preparar el medio a base de limón se utilizó 47.6 g de flavedo que se depositó en un matraz de 1 L con 680 mL de agua destilada. Se esterilizó el medio a 120 °C por 15 min y se vació 10 mL del sobrenadante en tubos falcón.

Desarrollo experimental

En cada tubo falcón, se depositaron 800 µL de la suspensión ajustada previamente de cada levadura y cuando fue en combinación se depositaron 200 µL de cada levadura más 800 µL de la suspensión ajustada previamente de *P. italicum*. Los tubos falcón se incubaron a 25 °C y 150 rpm por 24 h. Se tomaron alícuotas de 3 mL para determinar; carbohidratos totales, sacarosa, glucosa y fructosa, y de 1 mL para determinar el número de esporas germinadas del hongo. Se consideró a una espora germinada cuando el tubo de germinación era igual o mayor al tamaño de la espora. Se observaron 100 esporas por tratamiento y se realizaron tres repeticiones. El experimento se repitió dos veces.

Determinación de carbohidratos

Para la determinación del contenido de glucosa se utilizó el método GOD-PAD de Barham y Trinder (1972), utili-

zando el kit Randox (Randox México S.A. de C.V). Se mezclaron 5 mL de la muestra con 50 mL de la solución reactiva. Después de incubar 30 min se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 490 nm. Los valores se expresaron en mg·mL⁻¹. La fructosa se cuantificó por el método de Taylor (1995). Se adicionaron 5 mL de muestra, 20 mL triptamida-HCl y 600 mL de HCl concentrado. Los tubos se mezclaron y calentaron a 60 °C en baño maría por 15 min y se enfriaron en agua por 40 min. Finalmente, se midió en un espectrofotómetro la absorbancia a 518 nm. Las concentraciones se obtienen interpolando las absorbancias obtenidas con una curva de calibración de fructosa y sus valores se expresaron en mg/mL. La sacarosa se cuantificó con el método de Bruner (1964). Se mezclaron 2 mL de muestra y 4 mL de HCl 3 M, posteriormente se calentó a 100°C en baño maría por 15 min. Para neutralizar se añadieron 10 mL de KOH 5N y 600 mL de DNS (3,5-Dinitro ácido salicílico). La mezcla se calentó a 100 °C por 10 min en baño maría y se enfrió en agua con hielo. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 570 nm. El resultado se interpoló con una curva de calibración y los valores se expresaron en mg·mL⁻¹.

Antagonismo *in vivo* de levaduras de origen marino en frutos de limón persa con *P. italicum* y ulvan

Frutos de limón se lavaron con agua destilada estéril y desinfectados con hipoclorito de sodio al 5 % por 1 min (Yao *et al.*, 2004). Se enjuagaron en agua destilada estéril y se dejaron secar por 1 h en una campana de flujo laminar. Posteriormente, a cada fruto se le realizaron dos heridas de 2 mm de profundidad con una aguja estéril y en cada una se inocularon 20 µL de la suspensión ajustada previamente del fitopatógeno. Después, cada herida fue inoculada de manera individual o combinada con 20 µL de la suspensión ajustada previamente de cada levadura y ulvan. Un grupo de frutos fueron inoculados con el fitopatógeno más 15 µL del fungicida sintético Benomyl 50°. Otro grupo fue inoculado con el fitopatógeno y ulvan y un grupo control solo con *P. italicum*.

Los frutos se colocaron en recipientes de plástico estériles a 25 °C y 90 % HR por 7 días. Se cuantificó diámetro de lesión (mm) y la incidencia de la enfermedad (%DI) (Saranakumar *et al.*, 2016) mediante la fórmula: %DI = $FI/TF \times 100$. Donde: FI, es el número de frutos infectados y TF, es el total de frutos. Para confirmar los postulados de Koch se aisló cada hongo de los frutos enfermos en placas con PDA. Se utilizaron cinco frutos por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

Inducción de resistencia en frutos de limón persa inoculados con levaduras de origen marino, *P. italicum* y ulvan

Muestra

Para determinar la inducción de resistencia de frutos de limón persa inoculados con levaduras de origen marino, *P. italicum* y ulvan se cuantificó la actividad enzimática en los frutos a las 24 h después de la inoculación de cada tratamiento. Se hizo una mezcla compuesta de cada tratamiento colectado (1 g de tejido) de cada fruto. Las muestras fueron almacenadas a -40°C para su respectivo análisis.

Sobrenadante

De la mezcla compuesta se pesó 0.1 g de tejido y se colocó en un tubo eppendorf, después se le agregaron 2 mL de buffer de fosfato y se colocaron en un homogeneizador durante 60 s. Posteriormente, se centrifugaron a 10000xg por 13 min a 5°C. Transcurrido el tiempo, el sobrenadante se recuperó y se colocó en un tubo eppendorf y se almacenó a -40°C para su posterior análisis. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

Actividad enzimática

La actividad catalasa (CAT) se determinó en microplacas de 96 pozos, a cada uno se le agregaron 10 µL de buffer de fosfato 100 nM (pH 7.0), más 20 µL del extracto y se incubaron por 6 min. Transcurrido este tiempo se añadieron 20 µL de peróxido de hidrógeno 8.82 M y se les incubó por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 30 µL de hidróxido de potasio (KOH) 10 M, más 30 µL de reactivo Purlpad (23.5 M) y se les incubó por 10 min. Por último, se añadieron 10 µL de Peryodato de potasio 0.5 M en KOH 0.5 M, y se les volvió a incubar por 5 min. Finalmente, se hicieron lecturas a 540 nm en un espectrofotómetro. Para determinar la actividad de superóxido dismutasa (SOD), se utilizó una microplaca de 48 pozos, donde se colocaron 600 µL de buffer de fosfato. Posteriormente, se les agregaron 20 µL del extracto, se adicionaron 20 µL de xantina oxidasa y, se agregaron otros 600 µL de buffer de fosfato. Se hicieron lecturas a una absorbancia de 560 nm, cada 30 s durante 5 min. La actividad de peroxidasa (POX), se determinó en placas de 96 pozos colocando 10 µL del extracto, después se les adicionaron 50 µL de solución de guaiacol y la muestra se cuantificó a 436 nm en un espectrofotómetro. Los valores fueron expresados en U/g de proteína.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) utilizando el software STATISTICA 10.0 (paquete de software StatSoft, Tulsa, OK) y se utilizó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para la separación de medias. Antes del análisis de varianza, los porcentajes se transformaron en arcoseno-raíz cuadrada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento, identificación y patogenicidad de hongos aislados de frutos de limón persa

Se aislaron siete hongos de frutos de limón persa identificados como *Penicillium* spp. En la prueba de patogenicidad, de los aislamientos catalogados como; CV2T, C2T, NFC, VFC, 2FC, CVMT y BFC, solo los primeros dos tuvieron una incidencia del 100 % y el resto de los hongos no ocasionaron enfermedad sobre los frutos. El aislamiento C2T fue el que mayor daño ocasionó sobre los frutos con un diámetro de lesión de 49 mm seguido de CV2T con 39 mm. Los hongos CV2T y C2T fueron re-aislados de los frutos confirmando los postulados de Koch. A través de la región ITS1-5.8s-ITS2 del ADN, los siete hongos fueron identificados como *Penicillium*

italicum mostrando una identidad del 100 % según la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov).

El limón ocupa dentro de los cítricos el segundo lugar en importancia, tanto por su consumo en fresco como por su uso industrial. Dentro del contexto mundial, México está considerado como el principal país productor en las variedades persa y mexicano (SADER, 2019). Después de la cosecha, el limón se almacena y manipula en plantas de embalaje con el fin de mantener su vida y calidad poscosecha, así como reducir la descomposición debido a la infección por fitopatógenos (Papoutsis *et al.*, 2019). Sin embargo *P. italicum*, agente causal del moho azul, es uno de los principales hongos que causan pérdidas económicas de hasta el 80 % de la producción de cítricos a nivel mundial (El-Otmani *et al.*, 2011).

En México, *P. italicum* es uno de los principales fitopatógenos que causan pérdidas poscosecha cercanas al 50 % de la producción que incluye limón, naranja y mandarina (Ochoa *et al.*, 2007). Debido a la gran cantidad de esporas que produce *P. italicum*, infecta rápidamente a las heridas de los frutos por lo que su control debe ser durante y después de la cosecha, para evitar grandes pérdidas de fruta (Kellerman *et al.*, 2016). La rápida identificación de los fitopatógenos en poscosecha es fundamental para el manejo de las enfermedades en los cítricos limitando las pérdidas de fruta y manteniendo su calidad organoléptica (Kanashiro *et al.*, 2020).

Efecto de ulvan sobre *P. italicum* y levaduras de origen marino

La presencia de ulvan no influyó sobre la germinación de esporas de *P. italicum* (Figura 1). En relación a las levaduras de origen marino, no existió un efecto de ulvan sobre el crecimiento de los microorganismos (Figura 2). La dinámica de crecimiento fue similar entre todos los tratamientos.

Las algas marinas han recibido una gran atención durante los últimos años, debido a la química natural de sus productos (Pankiewicz *et al.*, 2016), principalmente a los polisacáridos que presentan diversas actividades biológicas como anticoagulantes, antivirales, antibacterianas, antitumorales, antiproliferativas, inmunomoduladoras, entre otras (Berri *et al.*, 2016). *Ulva* sp. es un alga verde marina que está

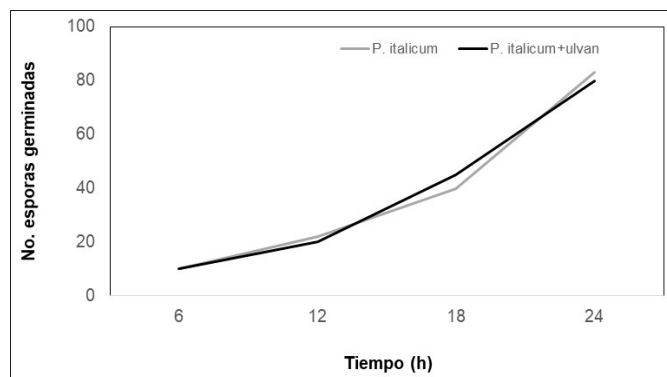


Figura 1. Dinámica de germinación de esporas de *P. italicum* con ulvan.
Figure 1. Spore germination dynamics of *P. italicum* with ulvan.

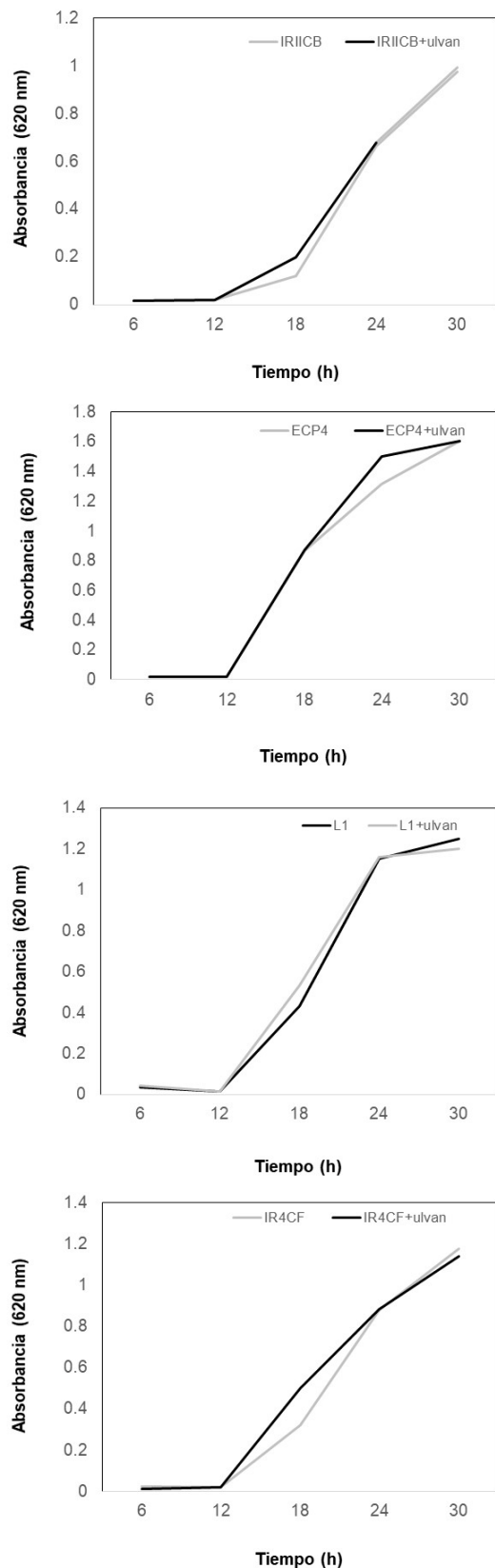


Figura 2. Dinámica de crecimiento de levaduras de origen marino con ulvan. ECP4 y L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* e IR4CF = *R. minuta*.
Figure 2. Growth dynamics of marine yeasts with ulvan. ECP4 and L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* and IR4CF = *R. minuta*.

recibiendo una gran atención, debido a sus propiedades físico-químicas y biológicas de posible interés para aplicaciones en diversas áreas como la cosmetología, medicina, agrícola, entre otras (Berri *et al.*, 2016).

Ulvan es un polisacárido aislado de *Ulva* sp. que presenta actividad antiviral, antibacteriano, antioxidante, antiparasitario, entre otros (Chiquito-Contreras *et al.*, 2019). En la agricultura, se ha utilizado como promotor del crecimiento vegetal e inductor de resistencia en las plantas, sin embargo, no presenta una acción antimicrobiana directa sobre los microorganismos (Rivas-García *et al.*, 2018). Su principal función en las plantas es inducir la producción de enzimas de defensa como la catalasa (CAT), peroxidasa (POX), polifenol oxidasa, superóxido dismutasa (SOD), compuestos fenólicos, proteínas relacionadas con la patogenia (PR), entre otros (Khedra *et al.*, 2020; Moenne *et al.*, 2020).

Antagonismo *in vitro* de levaduras de origen marino hacia *P. italicum*

Las levaduras de origen marino inhibieron el crecimiento micelial del fitopatógeno *in vitro* (Figura 3). La inhibición que ejercieron las levaduras de manera individual o en consorcio hacia *P. italicum* fue entre 21 y 38 %. El fungicida sintético Benomyl 50° solo limitó a 3 % el crecimiento de *P. italicum*.

Existen diversos reportes sobre la capacidad antagonista de levaduras hacia fitopatógenos, Taqarort *et al.* (2008) evaluaron el biocontrol de *P. digitatum* mediante el uso de las levaduras *Pichia anomala* y *D. hansenii*. Por su parte, Zhang *et al.* (2007) y Droby *et al.* (2009) observaron una disminución del moho azul por la acción de la levadura *Cryptococcus laurentii*. Sin embargo, la acción antagonista de los microorganismos puede potenciarse si se utilizan consorcios microbianos, los cuales pueden tener un mayor espectro de actividad, por lo tanto, pueden reducir la presencia de los fitopatógenos eficazmente en comparación con su aplicación de manera individual (Palmieri *et al.*, 2017). La eficiencia de los consorcios microbianos podría resultar no solo de la actividad de las especies individuales, sino también de su acción sinérgica que suprimirá el crecimiento de un fitopatógeno a través de diferentes mecanismos de acción (Panbianco *et al.*, 2015). La aplicación de consorcios microbianos ha mejorado la eficiencia del control biológico de enfermedades en muchos sistemas agrícolas (Jain *et al.*, 2020).

Por otra parte, el uso de fungicidas sintéticos sigue siendo la primera opción en el control de fitopatógenos de importancia agrícola (Zhu *et al.*, 2020). Para el control de *Penicillium* sp. se recomienda el uso de diversos fungicidas sintéticos, entre ellos el Benomyl 50°, sin embargo, han perdido eficiencia en el control del fitopatógeno debido a la resistencia que presentan algunas cepas de diversas especies de *Penicillium* (Moussa *et al.*, 2021).

Competencia por carbohidratos entre levaduras de origen marino y *P. italicum*

El contenido de fructosa, glucosa y sacarosa disminuyó significativamente en presencia de levaduras de origen ma-

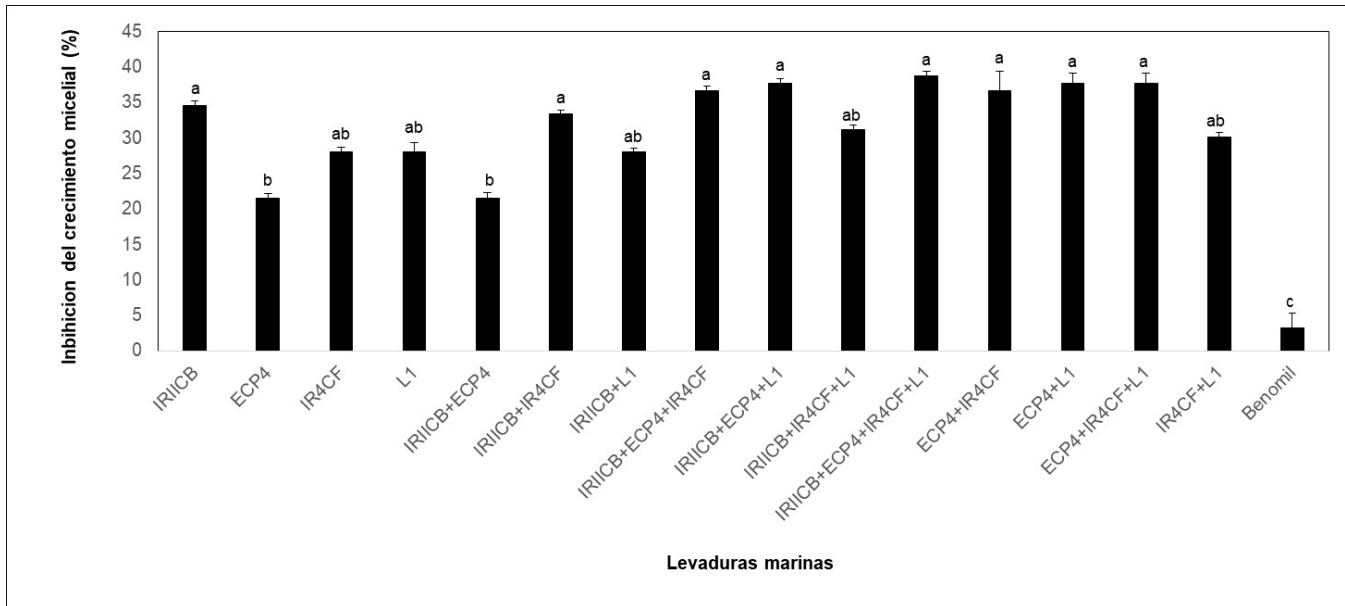


Figura 3. Efecto de la aplicación individual o en consorcio de levaduras de origen marino sobre el crecimiento micelial de *P. italicum*. ECP4 y L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* e IR4CF = *R. minuta*. Las líneas verticales sobre las barras representan la desviación estándar (n = 3). Las letras representan la diferencia estadística entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figure 3. Effect of the individual or consortium application of marine yeasts on the mycelial growth of *P. italicum*. ECP4 and L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* and IR4CF = *R. minuta*. Vertical lines on the bars represent the standard deviation (n = 3). Letters represent the statistical difference between treatments (Tukey, $P \leq 0.05$).

rino y *P. italicum* (Figura 4). El consorcio con ECP4, L1, IRIICB y IR4CF más el fitopatógeno fue el que disminuyó significativamente el contenido de carbohidratos en el medio de cultivo a base de flavedo de limón persa (control). Por otra parte, las levaduras de origen marino inhibieron significativamente el número de esporas germinadas de *P. italicum* (Figura 5). El consorcio conformado por ECP4, L1, IRIICB y IR4CF, inhibió en un 77 % la germinación de esporas del fitopatógeno. *P. italicum* germinó en un 89 %.

Todos los microorganismos requieren de azúcares como fuentes de carbono para su crecimiento y reproducción, la competencia por espacio y nutrientes es una vía antagónica de levaduras hacia fitopatógenos (Mukherjee *et al.*, 2020), este mecanismo es eficaz debido a que las levaduras tienen un metabolismo más rápido que el fitopatógeno, agotando rápidamente las fuentes de carbono (fructosa, glucosa, sacarosa, entre otros) y limitando a la germinación de esporas (Spadaro y Droby, 2016; Adrees *et al.*, 2019). Los

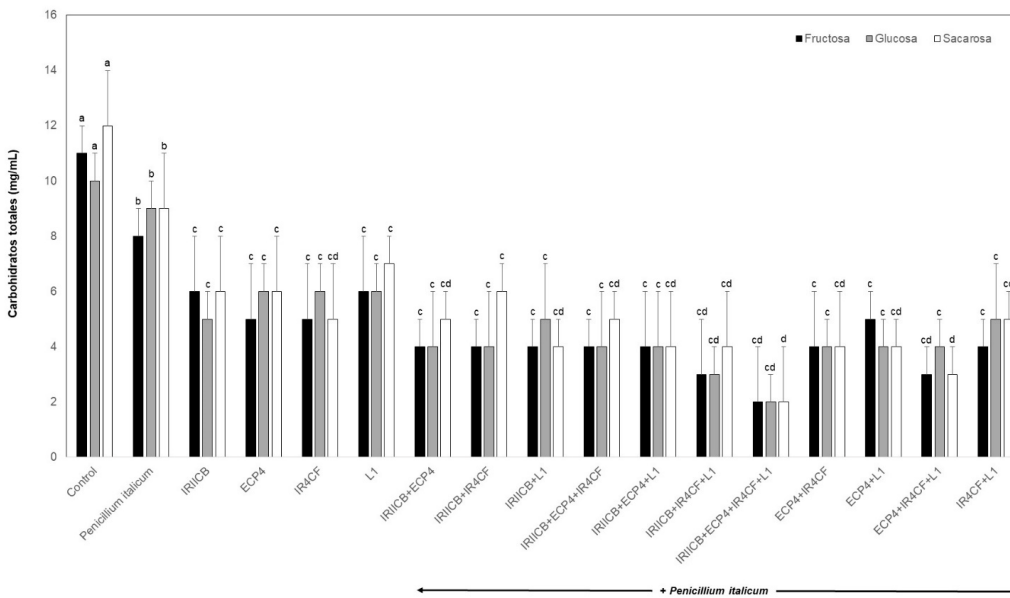


Figura 4. Contenido de carbohidratos en medio de cultivo a base de flavedo de limón persa inoculado con levaduras de origen marino y *P. italicum*. ECP4 y L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* e IR4CF = *R. minuta*. Las líneas verticales sobre las barras representan la desviación estándar (n = 3). Las letras representan la diferencia estadística entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figure 4. Carbohydrate content in culture medium based on Persian lemon flavedo inoculated with marine yeast and *P. italicum*. ECP4 and L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* and IR4CF = *R. minuta*. Vertical lines on the bars represent the standard deviation (n = 3). Letters represent the statistical difference between treatments (Tukey, $P \leq 0.05$).

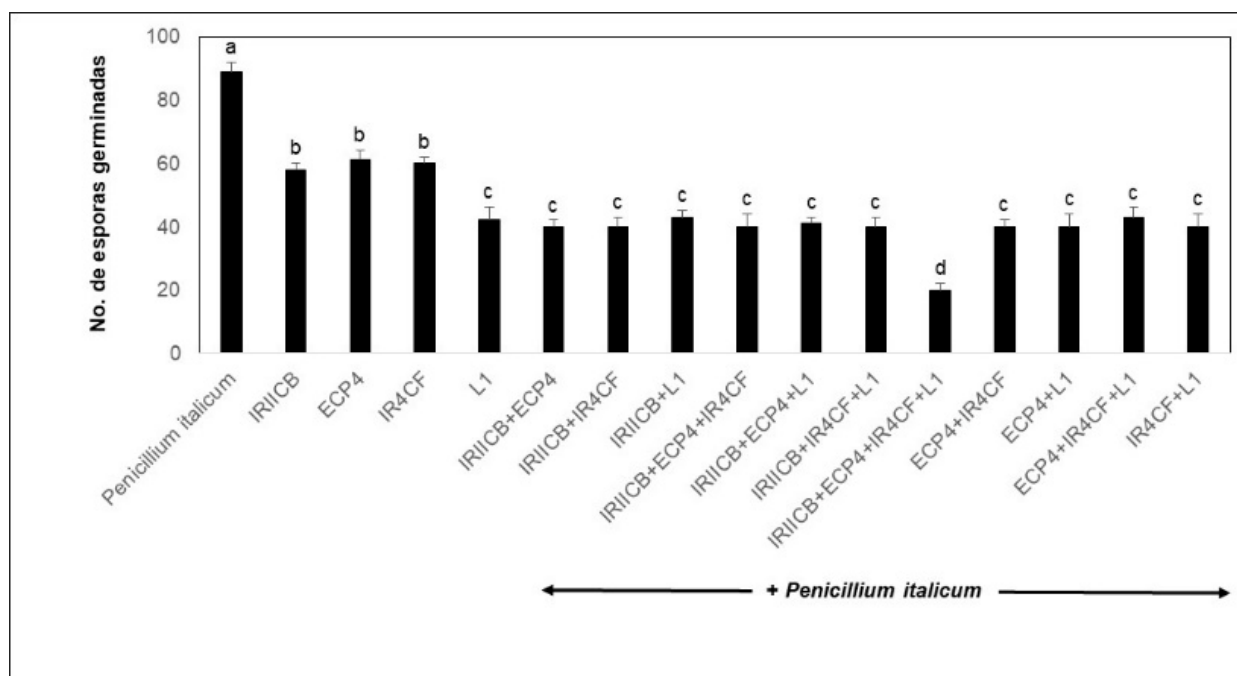


Figura 5. Germinación de esporas de *P. italicum* en medio de cultivo a base de flavedo de limón persa. ECP4 y L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* e IR4CF = *R. minuta*. Las líneas verticales sobre las barras representan la desviación estándar (n = 3). Las letras representan la diferencia estadística entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figure 5. Spore germination of *P. italicum* in a Persian lemon flavedo-based culture medium. ECP4 and L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* and IR4CF = *R. minuta*. Vertical lines on the bars represent the standard deviation (n = 3). Letters represent the statistical difference between treatments (Tukey, $P \leq 0.05$).

microorganismos antagonistas deben tener la capacidad de competir efectivamente por los nutrientes disponibles en el nicho ecológico para colonizar y limitar el crecimiento de los fitopatógenos. Al respecto, Spadaro *et al.* (2010), mencionan que los microorganismos antagonistas tienen la capacidad de asimilar una amplia variedad de mono y disacáridos. Hernández-Montiel *et al.* (2010), reportaron que las levaduras presentan una mayor tasa de consumo de glucosa y sacarosa que los fitopatógenos, lo cual restringe la germinación de la espora de los hongos.

Efecto levaduras de origen marino y ulvan en el control de *P. italicum* en frutos de limón persa

La incidencia de *P. italicum* en frutos de limón persa fue disminuida por la inoculación de levaduras de origen marino, ulvan y el fungicida sintético (Figura 6). La aplicación del consorcio microbiano con las cepas ECP4, L1, IRIICB y IR4CF disminuyó la incidencia de la enfermedad hasta en un 20 % y los frutos de limón persa con Benomyl 50° más *P. italicum* presentaron un 60 % de incidencia. En relación al diámetro de lesión, las levaduras de origen marino, ulvan y Benomyl 50° disminuyeron significativamente el daño ocasionado por el fitopatógeno en frutos de limón persa (Figura 7). Los frutos inoculados con el consorcio conformado por ECP4, L1, IRIICB y IR4CF presentaron el diámetro de lesión más bajo con valores de 2 mm. La aplicación de las levaduras de origen marino de manera individual o en consorcio disminuyó el diámetro de lesión en menos del 60 % en comparación con el tratamiento de los frutos con Benomyl 50° y el fitopatógeno.

P. italicum fue re-aislado de los frutos enfermos confirmando los postulados de Koch.

La actividad enzimática de POX, CAT y SOD fue incrementada en los frutos de limón persa inoculados con levaduras de origen marino y ulvan (Tabla 1). Los valores más altos de las enzimas fueron cuantificados en el tratamiento de los frutos con el fitopatógeno más las levaduras y ulvan.

Diversos mecanismos antagónicos por levaduras están relacionados con el control biológico de enfermedades en los frutos (Wassermann *et al.*, 2019), incluyendo la competencia por nutrientes y espacio, toxinas *killer*, producción de enzimas hidrolíticas, parasitismo, bio-películas, compuestos orgánicos volátiles, inducción de resistencia del hospedero, entre otros (Konsue *et al.*, 2020; Solairaj *et al.*, 2020). La protección de los frutos puede ser incrementada cuando se aplican más de dos microorganismos antagónicos compatibles (Zhimo *et al.*, 2020), los cuales presentan varias ventajas sobre el uso de una sola especie, incluida una mayor eficacia de biocontrol de los fitopatógenos, resistencia al estrés ambiental y rápida adaptación al hospedero (Pandhal y Noirel, 2014; Mukherjee *et al.*, 2020).

Por otra parte, levaduras de origen marino y ulvan son capaces de activar la producción de enzimas SOD, CAT y POX en diversos hospederos disminuyendo las infecciones ocasionadas por diversos fitopatógenos (Khedia *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). Las enzimas de defensa protegen a los frutos de diversas especies reactivas de oxígeno (ROS) causadas por fitopatógenos (Czarnecka *et al.*, 2019). Las ROS originan daños directamente sobre las células vegetales afectando

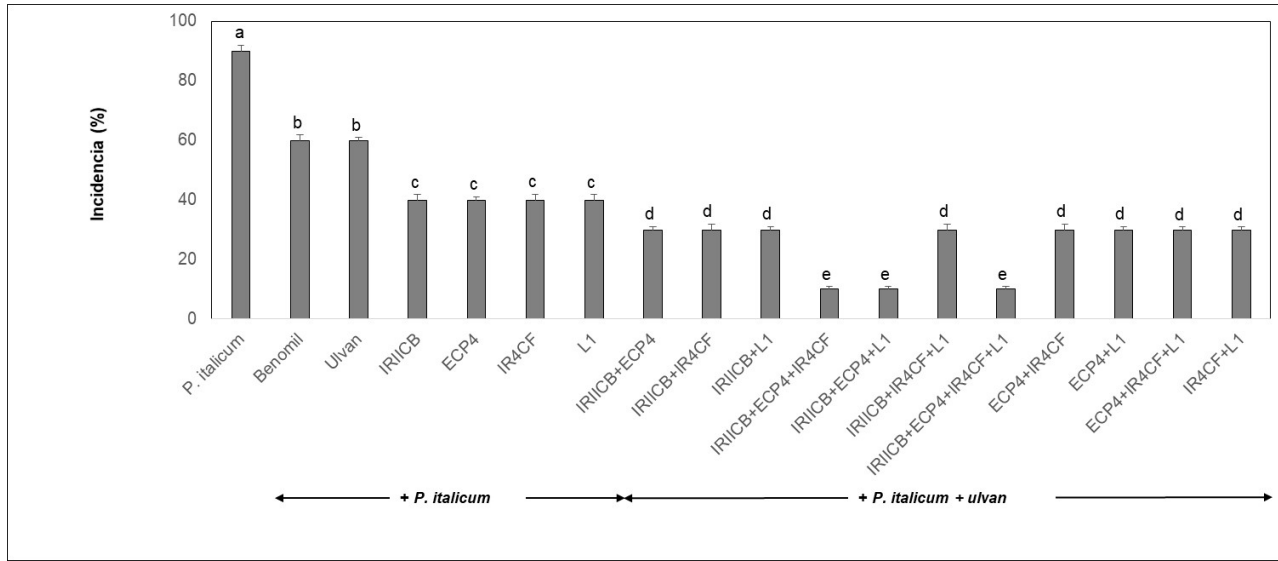


Figura 6. Incidencia de *P. italicum* en frutos de limón persa inoculados con levaduras de origen marino y ulvan. ECP4 y L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* e IR4CF = *R. minuta*. Las líneas verticales sobre las barras representan la desviación estándar (n= 5). Las letras representan la diferencia estadística entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figure 6. Incidence of *P. italicum* in Persian lemon fruits inoculated with marine yeasts and ulvan. ECP4 and L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* and IR4CF = *R. minuta*. Vertical lines on the bars represent the standard deviation (n= 5). Letters represent the statistical difference between treatments (Tukey, $P \leq 0.05$).

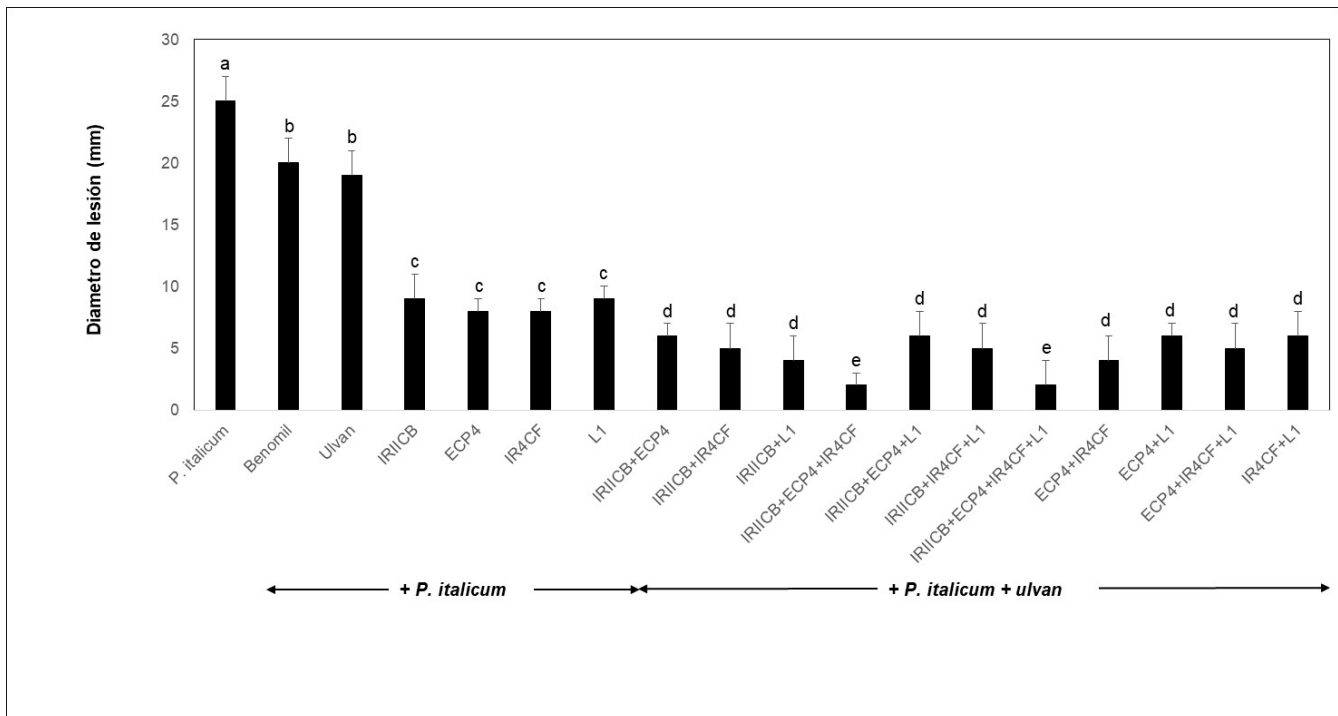


Figura 7. Diámetro de lesión ocasionado por *P. italicum* en frutos de limón persa inoculados con levaduras de origen marino y ulvan. ECP4 y L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* e IR4CF = *R. minuta*. Las líneas verticales sobre las barras representan la desviación estándar (n= 5). Las letras representan la diferencia estadística entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figure 7. Diameter of lesion caused by *P. italicum* in Persian lemon fruits inoculated with marine yeast and ulvan. ECP4 and L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* and IR4CF = *R. minuta*. Vertical lines on the bars represent the standard deviation (n= 5). Letters represent the statistical difference between treatments (Tukey, $P \leq 0.05$).

Tabla 1. Actividad enzimática de frutos de limón persa inoculados con levaduras de origen marino, ulvan y *P. italicum*.**Table 1.** Enzymatic activity of Persian lemon fruits inoculated with marine yeasts, ulvan and *P. italicum*.

Tratamiento [§]	Actividad enzimática (U/g de proteína)			
	POX [¶]	CAT	SOD	
<i>P. italicum</i>	8.41±2 d [‡]	7.98±1 g	6.35±2 e	
Ulvan+ <i>P. italicum</i>	14.92±3 b	10.28±2 e	8.19±1 d	
IRIICB+ <i>P. italicum</i>	8.19±2 d	7.78±2 g	10.67±1 c	
ECP4+ <i>P. italicum</i>	7.91±1 d	8.98±1 f	10.31±2 c	
IR4CF+ <i>P. italicum</i>	7.33±1 d	8.54±1 f	11.41±2 c	
L1+ <i>P. italicum</i>	8.28±2 d	5.47±3 h	10.11±3 c	
+ <i>P. italicum</i> + ulvan	IRIICB+ECP4	11.21±2 bc	12.64±3 cd	13.21±3 b
	IRIICB+IR4CF	11.92±3 bc	13.15±2 c	13.48±3 b
	IRIICB+L1	12.17±2 bc	12.87±3 cd	14.11±2 b
	IRIICB+ECP4+IR4CF	14.29±3 b	15.68±1 b	14.56±2 b
	IRIICB+ECP4+L1	14.89±1 b	16.47±1 b	14.89±3 b
	IRIICB+IR4CF+L1	15.27±1 b	15.87±2 b	15.13±2 b
	IRIICB+ECP4+IR4CF+L1	19.97±3 a	20.45±3 a	19.55±1 a
	ECP4+IR4CF	12.19±2 bc	12.35±2 c	14.38±1 b
	ECP4+L1	12.34±2 bc	13.01±1 c	13.98±2 b
	ECP4+IR4CF+L1	11.97±1 bc	13.22±1 c	14.78±2 b

[§]Tratamiento: ECP4 y L1 = *D. hansenii*, IRIICB = *C. laurentii* e IR4CF = *R. minuta*. [¶]Actividad enzimática: POX (peroxidasa), CAT (catalasa), SOD (superóxido dismutasa). [‡]Las letras en las columnas representan la diferencia estadística entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

diversas funciones metabólicas de las plantas (Qi *et al.*, 2019). La inducción de SOD en las plantas permite la reducción de las ROS en la célula, la POX y CAT disminuye y protege a las células vegetales de la actividad de H_2O_2 (Klein *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2020).

CONCLUSIONES

Las levaduras de origen marino (*D. hansenii*, *R. minuta* y *C. laurentii*) inhibieron *in vitro* e *in vivo* a *P. italicum*. La aplicación de los consorcios de levaduras y ulvan sobre los frutos de limón persa disminuyó al moho azul ocasionado por *P. italicum* superando al fungicida sintético Benomyl 50[®]. La competencia por fuentes de carbono e inducción de resistencia del hospedero son dos mecanismos antagónicos de levaduras hacia fitopatógenos. La validación de consorcios a base de microorganismos antagónicos en empacadoras de limón persa permitirá la disminución del uso de fungicidas sintéticos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el financiamiento del proyecto 352/2015. M.L. Vázquez-Vázquez agradece al CONACYT por la beca otorgada para realizar sus estudios de posgrado a nivel maestría. R.G. Chiquito-Contreras y L.G. Hernandez-Montiel fueron codirectores de tesis.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores de este trabajo no tienen ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Abouraicha, E., El-Alaoui-Talibi, Z., El-Boutachfai, R., Petit, E., Courtois, B., Coutois, J. and El Modafar, C. 2015. Induction of natural defense and protection against *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple fruit in response to bioelicitors isolated from green algae. *Scientia Horticulturae*. 181: 121-128.
- Adrees, H., Haider, M., Anjum, T. and Akram, W. 2019. Inducing systemic resistance in cotton plants against charcoal root rot pathogen using indigenous rhizospheric bacterial strains and chemical elicitors. *Crop Protection*. 115: 75-83.
- Berri, M., Slugocki, C., Oliver, M., Helloin, E., Jacques, I., Salmon, H., Demais, H., Le Goff, M. and Collen, P.N. 2016. Marine-sulfated polysaccharides extract of *Ulva armoricana* green algae exhibits an antimicrobial activity and stimulates cytokine expression by intestinal epithelial cells. *Journal of Applied Phycology*. 28: 2999-3008.
- Chen, C., Wan, C., Peng, X., and Chen, J. 2020. A flavonone pinocembroside inhibits *Penicillium italicum* growth and blue mold development in 'Newhall' navel oranges by targeting membrane damage mechanism. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 165: 104505.
- Cerna-Chávez, E., De Lira-Ramos, K., Ochoa-Fuentes, Y., Delgado-Ortiz, J., Cepeda-Siller, M. y González-Gaona, E. 2021. Actividad de extractos de plantas y hongos entomopatógenos para el control del picudo de la guayaba (*Conotrachelus dimidiatus* Champion) Coleóptera: Curculionidae. *Biotecnia*. 23(1): 70-76.
- Chiquito-Contreras, R., Murillo-Amador, B., Carmona-Hernandez, S., Chiquito-Contreras, C. and Hernandez-Montiel, L. 2019. Effect of marine bacteria and ulvan on the activity of antioxidant defense enzymes and the bio-protection of papaya fruit against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Antioxidants*. 8(12): 580.
- Collen, P. 2016. Marine sulfated polysaccharides extract of *Ulva armoricana* green algae exhibits an antimicrobial activity and stimulates cytokine expression by intestinal epithelial cell. *Journal of Applied Phycology*. 28: 2999-3008.
- Czarnecka, M., Żarowska, B., Połomska, X., Restuccia, C. and Cirvilleri, G. 2019. Role of biocontrol yeasts *Debaryomyces hansenii* and *Wickerhamomyces anomalus* in plants defense mechanisms against *Monilinia fructicola* in apple fruits. *Food Microbiology*. 83: 1-8.
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D. and Wilson, C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm?. *Postharvest Biology and Technology*. 52(2): 137-145.
- El-Otmani, M., Ait-Oubahou, A. and Zacarias, L. 2011. *Citrus* spp.: Orange, mandarin, tangerine, clementine, grapefruit, pomelo, lemon and lime. In: *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits* (pp. 437-516e). Woodhead Publishing.
- Fathollahi, I., Farmani, J., Kasaii, M. and Hamishehkar, H. 2021. Some physical properties of Persian lime (*Citrus latifolia*) seeds and physicochemical properties of the seed oil as affected by solvent extraction and cold pressing methods.

- Journal of Food Measurement and Characterization. 15: 1169-1178.
- FAO. 2019. Annual statistics. <http://www.fao.org>.
- Guo, K., Li, Z., Tian, H., Du, X., Liu, Z., Huang, H., Wang, P., Ye, Z., Zhang, X. and Tu, L. 2020. Cytosolic ascorbate peroxidases plays a critical role in photosynthesis by modulating reactive oxygen species level in stomatal guard Cell. *Frontiers in Plant Science*. 11: 446.
- Hernandez-Montiel, L., Ochoa, J., Troyo-Diéguez, E. and Larralde-Corona, C. 2010. Biocontrol of postharvest blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus *Debaryomyces hansenii* isolates. *Postharvest Biology and Technology*. 56(2): 181-187.
- Jain, A., Chatterjee, A. and Das, S. 2020. Synergistic consortium of beneficial microorganisms in rice rhizosphere promotes host defense to blight-causing *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Planta*. 252(6): 1-25.
- Jing, J., Zhang, H., Xue, Y. and Zeng, K. 2020. Effects of INA on postharvest blue and green molds and anthracnose decay in citrus fruit. *Journal of Integrative Agriculture*. 19(5): 1396-1406.
- Kanashiro, A., Akiyama, D., Kupper, K. and Fill, T. 2020. *Penicillium italicum*: An underexplored postharvest pathogen. *Frontiers in Microbiology*. 11: 606852.
- Kellerman, M., Joubert, J., Erasmus, A. and Fourie, P. 2016. The effect of temperature, exposure time and pH on imazalil residue loading and green mould control on citrus through dip application. *Postharvest Biology and Technology*. 121: 159-164.
- Khedra, J., Dangariya, M., Nakum, A., Agarwal, P., Panda, A., Parida, A., Gangapur, D., Meena, R. and Agarwal, P. 2020. Sargassum seaweed extract enhances *Macrophomina phaseolina* resistance in tomato by regulating phytohormones and antioxidative activity. *Journal of Applied Phycology*. 32(6): 4373-4384.
- Klein, A., Hüselmann, L., Keyster, M. and Ludidi, N. 2018. Exogenous nitric oxide limits salt-induced oxidative damage in maize by altering superoxide dismutase activity. *South African Journal of Botany*. 115: 44-49.
- Konsue, W., Dethoup, T. and Limtong, S. 2020. Biological control of fruit rot and anthracnose of postharvest mango by antagonistic yeasts from economic crops leaves. *Microorganisms*. 8(3): 317.
- Leyva-Acuña, M., Quintana-Obrigón, E., Soto-Landeros, F., Baez-Parra, K., Montes-Avila, J. y Angulo-Escalante, M. 2020. Actividad antifúngica de extractos metanólicos y alcaloides de *Jatropha platyphylla* contra *Aspergillus parasiticus*. *Biotecnica*. 22(3): 100-107.
- Li, B., Xu, H., Wang, X., Wan, Y., Jiang, N., Qi, H. and Liu, X. 2020. Antioxidant and antihyperlipidemic activities of high sulfate content purified polysaccharide from *Ulva pertusa*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 146: 756-762.
- Moenne, A., Gómez, M., Laporte, D., Espinoza, D., Sáez, C. and González, A. 2020. Mechanisms of copper tolerance, accumulation, and detoxification in the marine macroalga *Ulva compressa* (Chlorophyta): 20 years of research. *Plants*. 9(6): 681.
- Moussa, H., El Omari, B., Chefchaou, H., Tanghort, M., Mzabi, A., Chami, N. and Remmal, A. 2021. Action of thymol, carvacrol and eugenol on *Penicillium* and *Geotrichum* isolates resistant to commercial fungicides and causing postharvest citrus decay. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 43(1): 26-34.
- Mukherjee, A., Verma, J., Gaurav, A., Chouhan, G., Patel, J. and Hesham, A. 2020. Yeast a potential bio-agent: future for plant growth and postharvest disease management for sustainable agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 104(4): 1497-1510.
- Ochoa, J., Hernandez-Montiel, L., Latisnere-Barragan, H., León de la Luz, J. y Larralde-Corona, C. 2007. Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) cultivada en Baja California Sur, México. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5: 352-359.
- Ons, L., Bylemans, D., Thevissen, K. and Cammue, B. 2020. Combining biocontrol agents with chemical fungicides for integrated plant fungal disease control. *Microorganisms*. 8(12): 1930.
- Palmieri, D., Vitullo, D., De Curtis, F. and Lima, G. 2017. A microbial consortium in the rhizosphere as a new biocontrol approach against fusarium decline of chickpea. *Plant and Soil*. 412(1-2): 425-439.
- Pandhal, J. and Noirel, J. 2014. Synthetic microbial ecosystems for biotechnology. *Biotechnology Letters*. 36: 1141-1151.
- Panebianco, S., Vitale, A., Polizzi, G., Scala, F. and Cirivilleri, G. 2015. Enhanced control of postharvest citrus fruit decay by means of the combined use of compatible biocontrol agents. *Biological Control*. 84: 19-27.
- Pankiewicz, R., Leska, B., Messyasz, B., Fabrowska, J., Soloducha, M. and Pikosz, M. 2016. First isolation of polysaccharides ulvans from the cell walls of freshwater algae. *Algal Research*. 19: 348-35.
- Papoutsis, K., Mathioudakis, M., Hasperué, J. and Ziogas, V. 2019. Non-chemical treatments for preventing the postharvest fungal rotting of citrus caused by *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (blue mold). *Trends in Food Science and Technology*. 86: 479-491.
- Pérez-Nájera, V., Lugo-Cervantes, E., Gutiérrez-Lomelí, M. y Del-Toro-Sánchez, C. 2013. Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante. *Biotecnica*. 15(3): 18-22.
- Qi, C., Lin, X., Li, S., Liu, L., Wang, Z., Li, Y., Bai, R., Xie, Q., Zhang, N., Ren, S., Zhao, B., Li, X., Fan, S. and Guo, Y. 2019. SoHSC70 positively regulates thermotolerance by alleviating cell membrane damage, reducing ROS accumulation, and improving activities of antioxidant enzymes. *Plant Science*. 283: 385-395.
- Rivas-García, T., Murillo-Amador, B., Nieto-Garibay, A., Chiquito-Contreras, R., Rincon-Enriquez, G. and Hernandez-Montiel, L. 2018. Effect of ulvan on the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* and *Stenotrophomonas rhizophila* against fruit rot of *Cucumis melo* L. *Agronomy*. 8(12): 273.
- Sánchez-Espinosa, A., Villarruel-Ordaz, J. y Maldonado-Bonilla, L. 2021. Mycoparasitic antagonism of a *Trichoderma harzianum* strain isolated from banana plants in Oaxaca, Mexico. *Biotecnica*. 23(1): 127-134.
- SADER, 2019. Estadísticas de cítricos, Superficie Cosechada, Sembrada y Producción. www.gob.mx
- Solairaj, D., Legrand, N., Yang, Q. and Zhang, H. 2020. Isolation of pathogenic fungi causing postharvest decay in table grapes and *in vivo* biocontrol activity of selected yeasts against them. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 110: 101478.

- Spadaro, D., Ciavarella, A., Dianpeng, Z., Garibaldi, A. and Gullino, M. 2010. Effect of culture media and pH on the biomass production and biocontrol efficacy of a *Metschnikowia pulcherrima* strain to be used as a biofungicide for postharvest disease control. *Canadian Journal of Microbiology*. 56(2): 128-137.
- Spadaro, D. and Droby, S. 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science and Technology*. 47: 39-49.
- Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., Piombo, E., Wu, X. and Yue, J. 2020. Genome sequence, assembly, and characterization of the antagonistic yeast *Candida oleophila* used as a biocontrol agent against post-harvest diseases. *Frontiers in Microbiology*. 11: 295.
- Taqarort, N., Echairi, A., Chaussod, R., Nouaim, R., Boubaker, H., Benaoumar, A. and Boudyach, E. 2008. Screening and identification of epiphytic yeasts with potential for biological control of green mold of citrus fruits. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 3031-3038.
- Wassermann, B., Kusstatscher, P. and Berg, G. 2019. Microbiome response to hot water treatment and potential synergy with biological control on stored apples. *Frontiers in Microbiology*. 10: 2502.
- Zhang, H., Zheng, X. and Yu, T. 2007. Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*. *Food Control*. 18(4): 287-291.
- Zhang, X., Zong, Y., Li, Z., Yang, R., Li, Z., Bi, Y. and Prusky, D. 2020. Postharvest *Pichia guilliermondii* treatment promotes wound healing of apple fruits. *Postharvest Biology and Technology*. 167: 111228.
- Zhimo, V. Y., Biasi, A., Kumar, A., Feygenberg, O., Salim, S., Vero, S., Wisniewski, M. and Droby, S. 2020. Yeasts and bacterial consortia from kefir grains are effective biocontrol agents of postharvest diseases of fruits. *Microorganisms*. 8(3): 428.
- Zhu, J., Gao, J., Yang, C., Shang, X., Zhao, Z., Lawoe, R., Zhou, R., Sun, Y., Yin, X. and Liu, Y. 2020. Design, synthesis, and antifungal evaluation of neocryptolepine derivatives against phytopathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 68(8): 2306-2315.



Leptospirosis at human-animal-environment interfaces in Latin-America: drivers, prevention, and control measures

Leptospirosis en la interfaz humano-animal-ambiente en América Latina: determinantes, medidas de prevención y control

Guadalupe López-Robles¹, Francisca Nilza Córdova-Robles², Edgar Sandoval-Petris³, Maricela Montalvo-Corral^{2*}

¹ Departamento de Agricultura y Ganadería, Universidad de Sonora. Carr. Bahía de Kino Km. 21, 305, Hermosillo Sonora, México.

² Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Calle Gustavo Astiazarán Rosas, 83304, Hermosillo Sonora, México.

³ Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora. Blvd. Luis Donaldo Colosio s/n, 83000, Hermosillo Sonora, México.

ABSTRACT

Leptospirosis is one of the main re-emerging zoonotic diseases with a worldwide distribution, mainly in regions with hot or tropical climates. It is caused by the spirochetal bacteria of the genus *Leptospira*, which, in their pathogenic life forms, causes asymptomatic to severe infections in humans and animals. Animal-to-human transmission occurs most frequently in occupationally exposed groups and in travelers. However, leptospirosis also represents a disease associated with poverty and low sanitation environments, in rural and urban communities, in close contact with companion animals and livestock. A search was performed in PubMed, Scopus, Web of Science and Google scholar databases using query terms related to *Leptospira*/leptospirosis, reported during 1990-2020. This review focuses on the description of biologic and socioenvironmental drivers that influence the occurrence of the disease in humans. Leptospirosis is found at the human-animal-environment interfaces, and represents a challenge for public and animal health, and food production; hence, improving the strategies for prevention control and surveillance in Latin-American countries is critical, as one of the regions most affected by the disease.

Key words: Leptospirosis, human-animal-environment interfaces, drivers of occurrence, Latin-America.

RESUMEN

La leptospirosis es una de las principales enfermedades zoonóticas de distribución mundial, principalmente en regiones con climas cálidos o tropicales. Es ocasionada por la espiroqueta del género *Leptospira*, se presenta clínicamente de forma asintomática, con cuadros moderados o graves en humanos y animales. La transmisión de animal a humanos es más frecuente en grupos ocupacionalmente expuestos como trabajadores agrícolas y ganaderos, veterinarios, cazadores, trabajadores de rastros e incluso viajeros. Asimismo, también representa una enfermedad asociada a pobreza y ambientes de bajo saneamiento, en comunidades rurales y urbanas, en contacto cercano con animales domésticos y ganado. Se realizó una búsqueda en bases de datos de PubMed, Scopus, Web of Science y Google scholar, usando palabras

claves *Leptospira*/leptospirosis en el periodo 1990-2020. La revisión se enfoca en la descripción de determinantes biológicos y socioambientales que influyen en la ocurrencia de la enfermedad en humanos. La leptospirosis se encuentra en la interfase de la salud humana y animal, y representa un reto para la salud pública, animal, y la producción de alimentos; por lo que es crítica la mejora en las estrategias de prevención, control y vigilancia en países de Latinoamérica, una de las regiones más afectadas por la enfermedad.

Palabras clave: Leptospirosis, interfaz humano-animal-ambiente, determinantes de ocurrencia, Latinoamérica.

INTRODUCTION

The current SARS-CoV-2 pandemic is the latest example of the importance of zoonotic diseases, which are those transmitted from animals to humans, and are estimated to cause around 70 % of human infectious diseases (Jones *et al.*, 2008). Zoonoses, occur at human-animal-environment interfaces, thus highlighting the relevance of a One-health approach. Leptospirosis, caused by spirochetal bacteria of the *Leptospira* genus, is considered the most widely distributed zoonotic disease on the planet (Samsudin *et al.*, 2018). *Leptospira* has been isolated in many vertebrate taxa, including mammals, birds, amphibians, reptiles, and fish (Viera *et al.*, 2018; Cilia *et al.*, 2021), and has shown genetic heterogeneity. Leptospirosis represents a disease associated with poverty and low sanitation environments, both in rural and urban communities, as well as in livestock production areas, where close interaction with animals could favor the leptospirosis spread. It is also considered an occupational risk disease that affects persons who have contact with infected animals such as agricultural, livestock, meat, abattoir, and rice field workers, veterinarians, hunters, wild animals caretakers, and farmers (Richard and Oppliger, 2015; Bierque *et al.*, 2020).

It has been demonstrated that chronic leptospirosis can cause disability and significant economic losses. However, the infection can be confused with other febrile diseases such as dengue or influenza, due to its symptoms, and if not treated in time it could be lethal (Velasco-Castrejón *et al.*, 2009). Nowadays, leptospirosis is endemic in many areas

*Autor para correspondencia: Maricela Montalvo Corral
Correo electrónico: maricela.montalvo@ciad.mx

Recibido: 7 de abril de 2021

Aceptado: 10 de junio de 2021

and causes significant outbreaks after flooding events, it is a neglected disease not included in many infectious disease surveillance programs in humans and even less in animals. It is estimated that this infection is one of the main causes of economic losses related to livestock, causing reproductive problems in cattle, representing a potential agri-food vulnerability problem due to its impact on livestock production (Ellis, 2015; González and Macías, 2017; Garba *et al.*, 2018).

Due to complex interaction in the ecology and epidemiology of the disease, and multiple animal host and human conditions in urban and rural settlements, it is important to identify the drivers and risk factors that promote infection in exposed people. Leptospirosis has a variable distribution worldwide, with Latin-America as one of the most affected regions (Schneider *et al.*, 2017). We reviewed research articles in databases (PubMed, Scopus, Web of Science and Google scholar, published from 1990 to 2020), using query terms related to leptospirosis/*Leptospira* biological and socioenvironmental drivers that influence its occurrence in Latin-America. South America is the most affected region, but also an increasing incidence in other latitudes is evident. Well established surveillance programs to identify serovars circulation, including animals, vaccination use and human behavioral interventions, are identified as important measures that will serve as a basis for the design of appropriate interventions to prevent and control the disease in humans and animals.

Leptospirosis

Etiological agent and taxonomic classification

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by bacteria commonly known as leptospire. The word has its roots in the Greek *leptos* meaning thin and the Latin *spira* that means rolled (Levett and Haake, 2014). Leptospire are gram-negative bacteria that have lipopolysaccharide (LPS) in the outer membrane, a cell wall with peptidoglycan, and an inner membrane (Cameron, 2015). They are spirochetes of the order Spirochaetales, belonging to the family Leptospiraceae within which three genera are included, *Leptospira*, *Turneriella* and *Leptonema* (Levett, 2015). These organisms are differentiated by their guanine and cytosine content (GC), their 16s ribosomal RNA sequences and their DNA homology. The above allows classifying them in genres. *Leptospira* has a GC content of 33-43 %, *Leptonema* 54 % and *Turneriella* 53.6 % (Yasuda *et al.*, 1987; Stackebrandt *et al.*, 2013).

The *Leptospira* species have similarity in their morphology, structure and size (Levett, 2015). They have a spiral shape with ends similar to a hook, giving it the appearance of a question mark. They have a length of 6-20 µm and a diameter of 0.1 µm, as well as a wavelength of 0.5 µm. Pathogenic species isolated from mammals are more tightly rolled and shorter than saprophytic strains, while bacteria maintained under poor nutrient conditions have a more elongated structure and little motility (Cameron, 2015). The *Leptospira* virulence depends in large part on its LPS structure, which is the main recognized antigen during infection, and responsible for antigenic diversity and serogroup classification.

The serovar is the unit in which the *Leptospira* species are classified, and each exhibiting a different antigenic conformation. There are more than 300 serovars, which in turn have been classified by convenience in 32 serogroups, based on their antigenic homology (Caimi and Ruibal, 2020). *Leptospira* are conventionally divided into two species, the pathogenic *Leptospira interrogans* sensu lato and the saprophytic *Leptospira biflexa* sensu lato. Two strains will be considered as different serovars if, when performing a cross-agglutination absorption test (CAAT) with adequate amounts of a heterologous antigen, more than 10 % of the homologous titer consistently remains in at least one of the two antisera. An unknown isolated strain may correspond to a known serovar from which a reference strain, already existing or not, is considered as a reference strain for that serovar (WHO, 2009). Although used for decades in *Leptospira* serological classification, CAAT is currently in disuse, due to technical limitation, and microagglutination test (MAT) has become the gold standard test (Caimi and Ruibal, 2020).

Also, increased availability of high throughput molecular methods, such as Next Generation Sequencing and DNA-DNA hybridization techniques, have provided tools for *Leptospira* biodiversity and genomic analysis, even in harsh soil and water environmental samples. Recent studies based in molecular taxonomy classification have discovered new clades and species. According to whole genome sequencing analyzes and molecular phylogenetics reconstruction by maximum likelihood of the 16s rRNA sequences, authors have identified 64 species in the genus *Leptospira*. *Leptospira* species are divided into three clades and one subclade. One of the clades includes pathogenic bacteria (P1) e.i, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. santarosai*, *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. mayottensis*, *L. kmetyi*. The other is an intermediate group (P2) e.i, *L. wolffii*, *L. licerasiae*, *L. Inadai*, *L. fainei*, *L. broomii* and the third includes non-pathogenic or saprophyte bacteria (S1) e.i, *L. biflexa*, *L. idonii*, *L. meyeri*, *L. terpstrae*, *L. vanthielii*, *L. wolbachii*, *L. yanagawae*, and others (Vincent *et al.*, 2019; Guglielmini *et al.*, 2019).

Clinical presentation and diagnostics in humans

The *Leptospira* incubation period lasts ≈ 10 days and the disease occurs 5-14 days after the entry of the bacteria. The infection is divided into two phases, acute and immune, and may be asymptomatic in some cases (Wynwood *et al.*, 2014). In 90 % of patients, the leptospirosis acute phase lasts around 7 days. In this clinical stage, known as anicteric or benign, fever, photophobia, headache, arthralgia, chills, diaphoresis, asthenia, cough, nausea, vomiting and muscle pain can occur. In the immune phase, antibodies are produced (5-7 days after onset of infection), and excretion of the bacteria through urine starts when it establishes in the kidneys. However, in 5-10 % of cases there is an icteric or hepatonephrotic syndrome, also called Weil's syndrome, with severe multi-organ dysfunction (Galloway *et al.*, 2019). Death from this infection is commonly due to renal failure and pulmonary hemorrhage (Brett-Major and Coldren, 2012).

Since the clinical manifestation of leptospirosis depends on the contracted serovar (NOM-029-SSA2-1999), adequate diagnosis is a valuable support tool. Diagnostic tests can be divided into immunological, genomic and darkfield microscopy methods (Rajapakse *et al.*, 2015). The immunological methods include the antibodies titration in serological samples by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the gold standard method for leptospirosis diagnosis, microagglutination test (MAT). For MAT, titres $\geq 1:100$ are considered positive, for individual or paired serum samples (WHO, 2009). In recent infections, titres $\geq 1:400$ or fourfold increased between the acute and convalescent sample are classified as positive (Courdurie *et al.*, 2017). The genomic methods for *Leptospira* detection, includes conventional PCR, real-time PCR, RT-PCR and isothermal amplification. These highly sensitive methods are based on the amplification of leptospiral constitutive genes, such as the 16S ribosomal RNA gene, the B subunit of DNA gyrase and *secY*, and genes specific to pathogenic species such as *LipL32*, *lfb1* and *ompL1* (Ferreira *et al.*, 2014; Waggoner and Pinsky, 2016).

Ecological and environmental drivers for *Leptospira* transmission

Abiotic factors

Leptospirosis occurrence varies greatly in the world. Certain climatic conditions, such as temperature (4-40 °C), humidity greater than 20 %, and precipitation of each geographic location can favor the presence of *Leptospira* in some areas, being more frequent in tropical and subtropical climate, where the disease occurs throughout the year, while in temperate areas it occurs seasonally during the months with higher temperatures and rains. *Leptospira* also persists in nature, in soil and water at pH of 5.5-7.6, or even in cattle urine during 6-18 h at pH of 7-8 (Noguchi, 1918; Thibeaux *et al.*, 2017). In addition, some serovars are capable of surviving up to 344 days in water and maintaining their virulence by regulating essential genes to promote survival even under extreme conditions of temperature and osmolarity, including the interaction with environmental bacteria and formation of biofilms, which allows them to survive in urine and increase its resistance to antibiotics (Vinod-Kumar *et al.*, 2016; Barragan *et al.*, 2017; Bierque *et al.*, 2020). However, the complete information about the *Leptospira* extrinsic and intrinsic conditions for surviving in environment, are still under investigation.

Biotic factors

Animals that contract leptospirosis are divided into natural or maintenance, and incidental reservoirs. In natural reservoirs, the infection is endemic; leptospirosis is acquired at an early age and is usually transferred by direct contact with another infected animal. Incidental hosts are those that acquire the infection by direct contact with the natural reservoirs or by indirect contact with water or soil contaminated with *Leptospira*. Some species can be natural hosts for some serovars and incidental reservoirs for others (Levett, 2001). In addition, the same species can be a natural reservoir of different serovars in different regions of the planet (Hartskeerl

and Terpstra, 1996; Putz and Nelly, 2020). The main natural reservoirs of pathogenic leptospires are wild and synanthropic species. The bacteria resides in the kidneys of these animals, and they commonly do not show clinical signs of the disease. The presence of *Leptospira* in wild animals including mammals (mainly rodentia), birds, reptiles, and amphibians, have been thoroughly reviewed by Vieira *et al.* (2018) and Cilia *et al.* (2021), where many unconventional hosts were identified in North and Latin-American countries. Although wildlife has a real role in the *Leptospira* transmission cycles, information is still scarce for many regions of the world (Vieira *et al.*, 2018). In turn, the wildlife that naturally hosts *Leptospira* can infect humans and livestock animals with an important role in food systems, also, companion animals become an important source of infection for humans (Table 1).

Leptospirosis in incidental hosts causes a variety of acute clinical manifestations, like fever, respiratory disease, poor reproductive performance, low milk production, systemic failure, as well as urinary and hepatic insufficiency (Putz and Nally, 2020). However, in reservoirs, *Leptospira* can be present without causing major problems but could be eliminated through oral, renal, and reproductive ways (Ellis, 2015; Loureiro and Lilenbaum, 2020). Hence, carriers without symptoms may spread the infection possibly throughout their whole lives (Thiermann, 1982). Incidental leptospirosis in cattle is caused by serovars such as Pomona, Grippotyphosa and Icterohaemorrhagiae, related to pigs, rodents, and wildlife (Ellis, 2015). Natural leptospirosis is mainly caused by *L. interrogans* Hardjo, *L. borgpetersenii* Hardjo, *L. santarosai* Guaricura, all of the Sejroe serogroup (Loureiro and Lilenbaum, 2020). In swine, the most frequent serovars include *L. Lora*, Icterohaemorrhagiae, Pomona and Tarassovi (Pettrakovsky *et al.*, 2014). Due to its close contact with persons who work in the food production system, livestock animals play a critical role in the human-animal-environmental interface for *Leptospira* transmission because it represents a potential source for natural or incidental *Leptospira* to humans. Putz and Nally (2020), reported a comprehensive analysis of *Leptospira* serovar interactions and its clinical manifestation in some important species, as well as reviews of seroprevalence in animals from Latin-America and the Caribbean (Pinto *et al.*, 2016; Pratt and Rajeev, 2018).

On the other hand, dogs are one of the most important hosts for *Leptospira* in urban and rural settings, and are part of the transmission cycle. Infection caused by the serovar Canicola is considered the most common, being the contact with urine of infected dogs the main intra and inter-species route of transmission. Canine leptospirosis due to Icterohaemorrhagiae serovar is less frequent, and is associated to the presence of rodents as these are the main carriers and transmitters. Due to the behavioral habits of dogs such as sniffing, licking, and courtship, when several animals get together, intraspecies and interspecies transmission is favored, being stray dogs an important source of infection for "domiciled" dogs (Luna *et al.*, 2008). The domestic cat is another important companion animal that can be infected with *Leptospira*, however information is limited (Murillo *et al.*, 2020).

Table 1. Selected studies on *Leptospira* serovar identification in human, companion animals and livestock in different Latin-America countries.
Tabla 1. Estudios selectos sobre identificación de *Leptospira* en humanos, animales de compañía y animales de producción en diferentes países de Latinoamérica.

Host	Serovars	Geographic localization	References
Human	Andamana/Australis/Butembo/Copenhageni/Hardjo/Icterohaemorrhagiae/Patoc/Sentot/Tarassovi	Brazil	Jorge <i>et al.</i> , 2017 Oliveira <i>et al.</i> , 2017
	Ballum/Canicola/Hebdomadis/Icterohaemorrhagiae/Louisiana/Pomona/Pyrogenes	Cuba	Rodríguez <i>et al.</i> , 2018
	Bratislava/Canicola/Grippotyphosa/Hardjo/Icterohaemorrhagiae/Pomona/Pyrogenes//Pomona/Portland/Tarassovi/Wolffi	Mexico	Galarde-López <i>et al.</i> , 2021
Cattle	Australis/Bratislava/Canicola/Grippotyphosa/Hardjo/Icterohaemorrhagiae/Pomona/Pyrogenes/Sejroe/Shermani/Tarassovi/Wolffi	Brazil	Campos <i>et al.</i> , 2017 Fávero <i>et al.</i> , 2018 Jorge <i>et al.</i> , 2017
	Autumnalis/Ballum/Bratislava/Canicola/Djasiman/Icterohemorrhagiae/Mankarso/Tarassovi	Caribbean island Saint Kitts	Shiokawa <i>et al.</i> , 2019
	Bratislava/Canicola/Copenhageni/Grippotyphosa/Hardjo/Hebdomadis/Pomona/Tarassovi	Colombia	Taddei <i>et al.</i> , 2021
	Hebdomadis/Pomona/Tarassovi	Costa Rica	Sequeira <i>et al.</i> , 2016
	Australis/Autumnalis/Bataviae/Canicola/Copenhageni/Hardjo/Icterohaemorrhagiae/Pomona/Sejroe/Tarassovi	Ecuador	Ortega-Pacheco <i>et al.</i> , 2020
	Ballum/Canicola/Forthbragg/Grippotyphosa/Hardjo/Icterohaemorrhagiae	Jamaica	Brown <i>et al.</i> , 2011
	Bratislava/Canicola/Grippotyphosa/H89 hardjo prajitno/Hardjo/Icterohaemorrhagiae/Inifap/Paloalto/Pomona/Tarassovi/Wolffi	México	Carmona-Gasca <i>et al.</i> , 2011 Pedroza-Perez, 2008 Zárate-Martínez <i>et al.</i> , 2015
Swine	Castellonis/Icterohaemorrhagiae/Pomona/Wolffi	Argentina	Taddei <i>et al.</i> , 2021
	Australis/Autumnalis/Bratislava/Butembo/Canicola/Castellonis/Copenhageni/Grippotyphosa/Hardjo/Icterohaemorrhagiae/Panama/Patoc/Pomona/Pyrogenes/Shermani/Whitcombi	Brazil	Miraglia <i>et al.</i> , 2008 Miraglia <i>et al.</i> , 2012 Moreira <i>et al.</i> , 2018 Valença <i>et al.</i> , 2013
	Bratislava/Copenhageni/Djasiman/Icterohaemorrhagiae/Mankarso	Caribbean island Saint Kitts	Shiokawa <i>et al.</i> , 2019
	Canicola/Grippotyphosa/Hardjo/Icterohaemorrhagiae/Pomona	Colombia	Ospina-Pinto <i>et al.</i> , 2019
	Bataviae/Canicola/Hardjo/Icterohaemorrhagiae	Ecuador	Ortega-Pacheco <i>et al.</i> , 2020
	Bratislava/Forthbragg/Pomona	Jamaica	Brown <i>et al.</i> , 2011
	Ballum/Bataviae/Canicola/Djasiman/Hebdomadis/Louisiana/Panama/Pomona/Pyrogenes/Semarang/Tarassovi	Mexico	Sequeira <i>et al.</i> , 2016
Sheep	Australis/Autumnalis/Ballum/Bataviae/Bratislava/CopM20/Cynopteri/Djasiman/Grippotyphosa/Hardjo/Hebdomadis/Icterohaemorrhagiae/Javanica/Louisiana/Pomona/Pyrogenes/Wolffi	Brazil	Almeida <i>et al.</i> , 2019 Campos <i>et al.</i> , 2017 Costa <i>et al.</i> , 2016
	Copenhageni/Djasiman/Hardjo/Icterohaemorrhagiae/Mankarso/Pomona	Caribbean island Saint Kitts	Shiokawa <i>et al.</i> , 2019
	Canicola/Grippotyphosa/Hardjo/Icterohaemorrhagiae/Tarassovi	Ecuador	Orlando <i>et al.</i> , 2020
	Kennewicki	Uruguay	Hamond <i>et al.</i> , 2014
Goat	Australis/Bratislava/Canicola/Icterohaemorrhagiae/Pomona/Pyrogenes/Wolffi	Brazil	Campos <i>et al.</i> , 2017
	Bratislava/Djasiman/Hardjo/Mankarso	Caribbean island Saint Kitts	Shiokawa <i>et al.</i> , 2019
	Hardjo-prajitno/Icterohemorrhagiae	Mexico	Gaytán-Camarillo <i>et al.</i> , 2021
Dog	Ballum/Butembo/Canicola/Copenhageni/Hond Utrecht IV/Kito	Brazil	Jorge <i>et al.</i> , 2017 Miraglia <i>et al.</i> , 2012
	Canicola/Hardjo/Icterohaemorrhagiae/Grippotyphosa	Ecuador	Orlando <i>et al.</i> , 2020
	Ballum/Bratislava/Canicola17/Grippotyphosa/Icterohaemorrhagiae/Pyrogenes/Shermani	México	Hernández-Ramírez <i>et al.</i> , 2017
	Copenhageni	Trinidad	Suepaul <i>et al.</i> , 2010
Cat	Andamana/Autumnalis/Bataviae/Canicola/Patoc	Brazil	Dos Santos <i>et al.</i> , 2017
	Autumnalis/Copenhageni	Chile	Azócar-Aedo <i>et al.</i> , 2014 Dorsch <i>et al.</i> , 2020
	Australis/Canicola	Mexico	Ortega-Pacheco <i>et al.</i> , 2020
Horse	Australis/Ballum/Bataviae/Bratislava/Canicola/Copenhageni/Grippotyphosa/Bratislava/Hardjo/Hardjo bovis/Wolffi/	Brazil	Dewes <i>et al.</i> , 2020 Jorge <i>et al.</i> , 2017
	Canicola/Copenhageni/Sejroe/Cynopteri/Hardjo/Pomona/Autumnalis/Icterohaemorrhagiae/Grippotyphosa/Bataviae/Tarassovi/Australis	Ecuador	Orlando <i>et al.</i> , 2020

Occupational and behavioral drivers for *Leptospira* transmission

Occupational diseases are those acquired when exposed to risk factors related to work (WHO, 2002). Leptospirosis is considered an occupational disease for agricultural, livestock, meat, abattoir, and rice field workers, veterinarians, hunters, caretakers of wild animals, and farmers (Bengis *et al.*, 2004; Bierque *et al.*, 2020). This occurs due to close contact with animals which increases the risk of being exposed to potentially contaminated carcasses or live animals with *Leptospira* (WHO, 2009).

According to epidemiological estimates, 30 % of leptospirosis cases are due to occupational exposure (Richard and Oppliger, 2015). Most of the infectious agents that cause zoonotic diseases are considered occupational risk factors, since they occur sporadically or chronically in different professions. Livestock worker's activities (such as milking) which include contact with animal urine, increase exposure and risk of leptospirosis. In addition, making homemade cheese and washing hands or drinking water from cattle drinking fountains could be risk factors. In addition, the risk of contracting the infection is greater in personnel that assist in the livestock delivery and manipulate waste products, and it is aggravated when not wearing personal protective equipment (PPE) (WHO, 2009). There is also a greater risk in cattle owners or in people, whose occupation involves the manipulation of pig or bovine tissues (Leal-Castellanos *et al.*, 2003). Carrying out necropsies on mortality events and obstetric management of sows is a routine activity on technified farms, and due the asymptomatic presentation of the disease, it represents a high risk for workers (Botazzo *et al.*, 2002). In addition, workers previously diagnosed with leptospirosis are more likely to be seropositive than those who have not previously had the disease. This suggests that those who already suffered from the disease may present behaviors that increase their exposure (Sanhueza *et al.*, 2017).

Moreover, people who do outdoor activities are more at risk of contracting leptospirosis than those who work indoors (Kamath *et al.*, 2014). In a meta-analysis study carried out in 7,000 feverish cases globally associated with travelers, a prevalence of 0.21-2.65 % for *Leptospira* was found (Bandara *et al.*, 2014). Other behaviors that increase the risk of getting sick are swimming in areas where cattle drink water, and keeping puddles near the house. Likewise, people with skin cuts exposed to floodwater are at greater risk of having leptospirosis (Leal-Castellanos *et al.*, 2003).

In addition, other studies revealed that having frequent contact with animals such as rats, mice, guinea pigs and poultry, or living with pets such as dogs, cats, and rats, and walking barefoot, increases the risk of leptospirosis (Brockmann *et al.*, 2016; Sanhueza *et al.*, 2017). Other risk factors associated with leptospirosis in humans, are the limited knowledge of the disease and its transmission, low educational attainment, younger age, and unhealthy behaviors (inadequate or missing hand washing and PPE) (Brown *et al.*, 2011). Also, belonging to the male gender, working age,

working in the field, and poverty, are risk factors associated with the disease (Carvajal and Fagerstrom, 2017; Dhewantara *et al.*, 2018).

Transmission of *Leptospira* at human-animal-environment interfaces

After a *Leptospira* infection, natural reservoirs, such as herbivores and other animals, may become asymptomatic carriers and, in consequence, an important source of *Leptospira* shedding into the environment by bacteria secretion in urine. This is a renal carrier state and considered the most important mechanism that enables the persistence of leptospirosis in the environment (Adler and de la Peña-Moctezuma, 2010). Therefore, during its life cycle it can be transmitted to incidental hosts, such as humans or domestic livestock, Figure 1 (Bengis *et al.*, 2004; Ko *et al.*, 2009; Haake and Levett, 2015). Once the leptospires enter a new host, they spread through the peritubular capillaries or glomeruli to the kidneys, via the hematogenous route. When they enter the renal tubular lumen, they invade the brush border of the proximal tubule through which urine is eliminated (Haake and Levett, 2015).

After direct exposure to infected urine, milk or reproductive fluids of carrier animals, or indirect exposure to soil, water or food contaminated with the bacteria (Galloway *et al.*, 2019), *Leptospira* can enter a new host through skin lesions and oral, genital, nose, or conjunctive mucous mem-

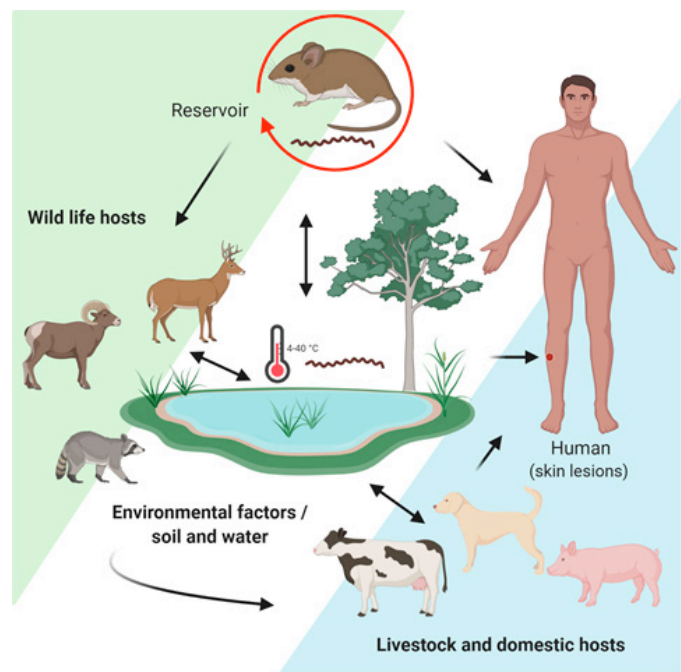


Figure 1. The cycle of *Leptospira* transmission influenced by environmental factors. Occurrence is affected by the transmission dynamics between asymptomatic and synantropic (rodents) wild reservoirs carriers, and other wildlife, environmental, and domestic and livestock that acts as incidental or reservoir hosts. Transmission to human is mediated by contact with hosts or direct by contaminated water and soil. Pathogenic *Leptospira* penetrates through mucous membranes and skin lesions (Levet, 2015) (Created by BioRender.com).

Figura 1. El ciclo de transmisión de *Leptospira* influenciado por factores ambientales.

branes. Although indirect contact is the most common form of *Leptospira* transmission, direct contact is also associated with occupational transmission (Haake and Levett, 2015).

Humans can excrete leptospires in urine for several weeks, and even years after the acute phase of the disease (Bharti *et al.*, 2003). However, there is no evidence supporting this as an important source of *Leptospira* in the environment, since their urine is acidic and leptospires require a pH of 6-8 to survive, therefore, human-to-human transmission is rare (Castillo-Hernández, 2014; Kamath *et al.*, 2014). *Leptospira* can also spread through sexual intercourse (Harrison and Fitzgerald, 1988). In addition, mothers can infect the fetus through the placenta, which can cause fetal death or miscarriage, the latter being more common in women who have developed leptospirosis in the first months of pregnancy (Haake and Levett, 2015). Although the mother's disease not necessarily affects the fetus (Shaked *et al.*, 1993), the baby could acquire the infection during breastfeeding (Bolin Koellner, 1988). In addition, blood can also participate as an infectious medium since the bacteria are present in it the first 10 days of infection (Budihal and Perwez, 2014).

Epidemiology of human leptospirosis

Annually there are approximately 1.03 million cases of leptospirosis and 58,900 deaths worldwide, and is one of the zoonoses that causes more morbidity and mortality globally (Costa *et al.*, 2015). The incidence is seasonal, and can be associated with climatic conditions; in temperate regions the incidence rate is 0.1-1 / 100,000 inhabitants, in humid tropical climates the incidence rate is 10 / 100,000 inhabitants, and in regions with outbreaks or with risk groups is 100 / 100,000 inhabitants (WHO, 2009). There is a greater number of cases in rainy seasons in warm and dry regions, since water provides the means of survival for *Leptospira* (Levett, 2004). In addition, it is endemic to tropical and subtropical zones, such as Latin-America and the Caribbean (Adler and de la Peña-Moctezuma, 2010). South America is the most affected region, despite many cases are reported in other northern countries (Schneider *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2018).

In a meta-analysis assessment of 17 studies carried out in different Latin-American countries (including Colombia and Puerto Rico), a prevalence of 16 % was found in 13,539 cases with acute fever (Moreira *et al.*, 2018). In another meta-analysis study using data provided by health authorities from different Latin-American and Caribbean countries, based on data published in the 2006-2013 period, the countries with the highest prevalence reports were Trinidad and Tobago with 22 / 100,000 inhabitants, and Uruguay with 13.9 / 100,000 inhabitants. The countries that reported the highest proportion of positive cases for *Leptospira* were Guyana with 37 %, Jamaica with 31.9 %, Cuba with 27.6 %, Peru with 27.3 % and Argentina with 22.4 % (Pulido-Villamarín *et al.*, 2014).

In a study conducted by Meny *et al.* (2019), in a region of Uruguay, a *Leptospira* seroprevalence of 46 % was found; in addition, the contact with animals and unsafe water conditions were observed as the main risk factors (Meny *et al.*,

2019). On the other hand, in a retrospective study carried out by the Costa Rican Ministry of Health in the period 2011-2015, a prevalence of 10.6 % was found in 5,056 patient samples (Carvajal and Fagerstrom, 2017). A descriptive epidemiological study carried out in Brazil, described the confirmed cases for the 2007-2016 period, reporting 39,263 cases with an annual mean of 3,926 and an incidence of 1.02 / 100,000 inhabitants. They also estimated a lethality of 8.9 % with a distribution of 79.2 % in urban areas with little sanitary infrastructure, which predisposed the infestation by rodents and contact with water and/or flood mud (Flores *et al.*, 2020). In Latin-America through national surveillance programs during 2010-2014, cases mainly distributed in Brazil, Peru, Colombia, and Ecuador (Schneider *et al.*, 2017).

In México, during a dengue outbreak in the Yucatan Peninsula, it was found that 14 % of suspected dengue cases patients had leptospirosis. The symptoms and signs that manifested the positive people to *Leptospira* belonged to the anicteric presentation, and were like those of dengue. The serovars found were Canicola, Pomona and Grippityphosa (Zavala-Velázquez *et al.*, 1998). Since leptospirosis clinical presentation is confused with other febrile diseases, is considered a public health problem that is not addressed and is underdiagnosed (Velasco-Castrejón *et al.*, 2009). In Tamaulipas, 8.2 % of the trail workers had seropositivity to leptospirosis and the predominant serovars were Bratislava and Hardjo; two people had antibodies for three serovars, eight for two and fourteen for only one (Rodríguez-Parra *et al.*, 2009).

In Mexico, during 1992-1997, the National Institute of Epidemiological Diagnosis and Reference found a seropositivity of 30.3 % for leptospirosis. The most common serovars were Pomona, Canicola and Icterohaemorrhagiae. Later, in 1998, they registered 119 leptospirosis cases and the majority was concentrated in Distrito Federal, Hidalgo and Guerrero (NOM-029-SSA2-1999). During 2000-2010, there were 1,547 cases and 198 deaths by leptospirosis in Mexico (Sanchez-Montes *et al.*, 2015). Therefore, the case-fatality rate was 12.8 %, higher than Malaysia (1.47 %) (Tan *et al.*, 2016), Trinidad and Tobago (5.8 %) (Mohan *et al.*, 2009) and Hawaii, United States (0.5 %) (Katz *et al.*, 2011). This could be due to the delay in the diagnosis, the confusion of the symptoms with those of other diseases or an adequate treatment (Budihal and Perwez, 2014). The only states that did not present cases were Durango, Baja California, Queretaro, Guanajuato, and Zacatecas. While those with the highest incidence were Veracruz, Tabasco, and Sinaloa, the actual number of people who had leptospirosis is unknown (Sanchez-Montes *et al.*, 2015). It was determined that leptospirosis cases in Mexico occur throughout the year, however endemic peaks were observed during the months of August, September, and October (Yescas-Benitez *et al.*, 2020).

In several studies conducted in different regions of Mexico, in occupational exposed workers and rural communities, authors found a 12-40 % seroprevalence (Leal-Castellanos *et al.*, 2003; Rivera-Benitez *et al.*, 2014; Vado-Solis *et al.*,

2014; Alvarado-Esquivel *et al.*, 2015; Cordova-Robles, 2019). The main serovars were Canicola and Hardjo, indicating that dogs and cattle are an important source of contagion for livestock workers. Although Mexico has a surveillance and control program for leptospirosis outbreaks, many cases might not be detected due to lack of differential diagnosis with other febrile illnesses or mild/asymptomatic cases.

Prevention and control measures

Vaccines and prophylaxis

The application of vaccines in humans and animals, is an option to prevent leptospirosis, and some vaccines may protect against serovars different from the one used to manufacture them due to cross-reactivity (Matsuo *et al.*, 2000). However, they can be serotype dependent and unable to induce an immune response against other serovars (Sonrier *et al.*, 2000). In addition, the genetic and phenotypic diversity of infectious leptospires is an obstacle to the development of vaccines (Grassmann *et al.*, 2017). Only one country in Latin-America, Cuba, uses routinely human vaccination against *Leptospira* (Pereira *et al.*, 2018), Normally using inactivated vaccines applied to domestic animals and livestock. In some countries, it is also applied to human populations at risk. However, due to side effects in humans, lack of cross protection and short duration of immunity, they are not used globally (Grassmann *et al.*, 2017).

Several vaccines are available; bacterins are vaccines made from whole dead cells and are the most common type of biologic available globally. The disadvantages are high production costs, local and systemic reactions, and a short period of immunity. In addition, protection is restricted to antigenically related serovars. Therefore, polyvalent vaccines have been used in domestic animals such as cattle. The immune protection can last from 6 months to 3 years depending on the adjuvants used in the vaccine, and human vaccine formulations have shown efficacy rates of 60-100 % (Koizumi and Watanabe, 2005).

Recombinant DNA vaccines have advantages such as low production cost, stability, and ability to elicit humoral and cell-mediated immune response against several serovars in the long term. DNA vaccines have been designed against conserved genes among the pathogenic leptospires and are highly immunogenic. The insertion of genes such as LipL32, OmpL1 and LipL41 in different vectors have been tested as vaccines in animal models (Bashiru and Bahaman, 2018).

Another alternative available against leptospirosis is chemoprevention prophylaxis, mainly used when the infection risk is high and there will be a forced exposure. Oral ingestion of a weekly 200 mg dose of doxycycline has been effective in reducing clinical infection, but it does not prevent infection, although significantly reduces morbidity and mortality (Sehgal *et al.*, 2000).

Hygiene, PPE and environmental control

Among the leptospirosis prevention measures, is the use of protecting clothing that covers wounds and reduces

the risk of disease appearance (OMS, 2008), as well as personal protection equipment such as overalls, gloves, boots, and goggles, when in contact with livestock, preventing skin and mucous membranes exposure (NOM-029-SSA2-1999). To prevent leptospirosis, hands should be washed after contact with animals and their derivatives, and rodent population, should be controlled. In addition, it is necessary to disinfect animal breeding sites. Furthermore, people should have regular clinical and laboratory tests, especially if there is a suspicion of infection. Vaccination of cattle and pets is also necessary. It is important to avoid swimming in waters that animals have access to, adding chlorine to water sources for human use, and boiling it before consumption. Likewise, avoiding the formation of water clusters in work areas is important to reduce the potential for leptospirosis outbreaks (NOM-029-SSA2-1999).

Education and interventions

The risk of infection is reduced by avoiding contact with the carrier host or contaminated environment. It is important to raise awareness among the population, especially at-risk groups, about leptospirosis, so an early detection and adequate treatment is possible (WHO, 2009). This is achievable through education campaigns or interventions promoting preventive health behaviors among high-risk groups (Rahman *et al.*, 2018).

Surveillance and future challenges

Surveillance systems and health policies for human leptospirosis in Latin-America have been reviewed previously by Schneider *et al.* (2017) and Pereira *et al.* (2018). The identification of *Leptospira* reservoirs, and the understanding of the eco-epidemiology of the bacteria in the environment and in animal hosts, are key in designing strategies for control. Different serovars of *Leptospira* may differ in their virulence, so the true magnitude of the health risk due to leptospirosis is unknown. On the other hand, it is possible for the infection to remain asymptomatic and undiagnosed, resulting in an underestimation of the seroprevalence. Therefore, it is necessary to investigate which serovars are in the affected area to implement or improve vaccination strategies, and determine the actual number of people that are seropositive (Richard and Oppliger, 2015; Sanchez-Montes *et al.*, 2015). Once taught as a predominant disease in tropical countries, some researchers estimate that climate change will increase distribution range due to changes in temperature, extreme rainy season and flooding events that will increase occurrence of *Leptospira* and leptospirosis in the next years (Lau *et al.*, 2010), thus many gaps in knowledge need to be addressed.

CONCLUSIONS

Leptospirosis is a re-emerging zoonotic disease of global importance. Human and animal leptospirosis cases are increasingly detected in many regions and territories in rural and urban settings in Latin-America, mainly in South-American countries. Serovar, host diversity and socio-

environmental conditions mediate complex interactions of its ecology and epidemiology in this region. Diagnosis of leptospirosis is not conducted systematically in all regions of Latin-America, including Mexico, although surveillance of the disease in human and animal with appropriate diagnostic methods might play an important role in prevention and control of leptospirosis outbreaks. Also, risk mitigation measures in occupational exposed populations through modifications in behavioral determinants, animal vaccination and educational interventions might help decrease transmission to human hosts. Although leptospirosis is an important zoonotic disease at human-animal-environmental interfaces, it is neglected and underdiagnosed. Studies with a One Health approach in Latin-American regions are relevant and necessary, representing a challenge for public and animal health, and food systems.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Dr. Salvador Icedo Núñez content review and comments. We thank to Ing. Rodrigo Sánchez for the english edition of the manuscript

REFERENCES

- Almeida, D.S., Paz, L.N., de Oliveira, D.S., Silva, D.N., Ristow, P., Hamond, C., Costa, F., Portela, R.W., Estrela-Lima, A. and Pinna, M.H. 2019. Investigation of chronic infection by *Leptospira* spp. in asymptomatic sheep slaughtered in slaughterhouse. *PLoS One*. 14:e0217391.
- Adler, B. and de la Peña-Moctezuma, A. 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*. 140:287-296.
- Alvarado-Esquivel, C., Sanchez-Anguiano, L.F. and Hernandez-Tinoco, J. 2015. Seroepidemiology of *Leptospira* Exposure in General Population in Rural Durango, Mexico. *BioMed Research International*. 2015:460578.
- Azócar-Aedo, L., Smits, H. and Monti, G. 2014. Leptospirosis in dogs and cats: epidemiology, clinical disease, zoonotic implications and prevention. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 46:337-348.
- Bandara, M., Ananda, M., Wickramage, K., Berger, E. and Agampodi, S. 2014. Globalization of leptospirosis through travel and migration. *Globalization and Health*. 10:1-9.
- Barragan, V., Olivás, S., Keim, P. and Pearson, T. 2017. Critical knowledge gaps in our understanding of environmental cycling and transmission of *Leptospira* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 83.
- Bashiru, G. and Bahaman, A.R. 2018. Advances & challenges in leptospiral vaccine development. *The Indian Journal of Medical Research*. 147:15-22.
- Bengis, R.G., Leighton, F.A., Fischer, J.R., Artois, M., Morner, T. and Tate, C.M. 2004. The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Épizooties*. 23:497-511.
- Bharti, A.R., Nally, J.E., Ricaldi, J.N., Matthias, M.A., Diaz, M.M., Lovett, M.A., Levett, P.N., Gilman, R.H., Willig, M.R., Gotuzzo, E., Vinetz, J.M. and Peru-United States Leptospirosis, C. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet. Infectious diseases*. 3:757-771.
- Bierque, E., Thibeaux, R., Girault, D., Soupé-Gilbert, M.E. and Goarant, C. 2020. A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. *PLoS One*. 15:e0227055.
- Bolin, C.A. and Koellner, P. 1988. Human-to-human transmission of *Leptospira interrogans* by milk. *The Journal of Infectious Diseases*. 158:246-247.
- Botazzo, A., Freitas, J.C., Bracarense, A.P., Eckehardt, E. and Oliveira, R. 2002. Leptospirosis in slaughtered sows: serological and histopathological investigation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33:174-177.
- Brett-Major, D.M. and Coldren, R. 2012. Antibiotics for leptospirosis. *The Cochrane database of systematic reviews*. CD008264.
- Brockmann, S.O., Ulrich, L., Piechotowski, I., Wagner-Wiening, C., Nockler, K., Mayer-Scholl, A. and Eichner, M. 2016. Risk factors for human *Leptospira* seropositivity in South Germany. *SpringerPlus*. 5:1796.
- Brown, P., McKenzie, M., Pinnock, M. and McGrowder, D. 2011. Environmental risk factors associated with leptospirosis among butchers and their associates in Jamaica. *The international Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 2:47-57.
- Budihal, S.V. and Perwez, K. 2014. Leptospirosis diagnosis: competency of various laboratory tests. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*. 8:199-202.
- Caimi, K. and Ruybal, P. 2020. *Leptospira* spp., a genus in the stage of diversity and genomic data expansion. *Infection, Genetics and Evolution*. 81:104241.
- Cameron, C.E. 2015. Leptospiral structure, physiology, and metabolism. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 387:21-41.
- Campos, Â.P., Miranda, D.F.H., Rodrigues, H.W.S., Lustosa, M.d.S.C., Martins, G.H.C., Mineiro, A.L.B.B., Castro, V., Azevedo, S.S. and de Sousa Silva, S.M.M. 2017. Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in cattle, sheep, and goats at consorted rearing from the State of Piauí, northeastern Brazil. *Tropical animal health and production*. 49:899-907.
- Carmona-Gasca, C.A., Lara, L.L., Castillo-Sánchez, L.O., Ramírez-Ortega, J.M., Palomera, C.L. and de la Peña-Moctezuma, A. 2011. Detection of *Leptospira santarosai* and *L. kirschneri* in cattle: new isolates with potential impact in bovine production and public health. *Veterinaria Mexico*. 42:277-288.
- Carvajal, M.P. and Fagerstrom, K.A. 2017. Epidemiology of Leptospirosis in Costa Rica 2011-2015. *Current Tropical Medicine Reports*. 4:41-46.
- Castillo-Hernández, M. 2014. *Leptospira* en ganado bovino. Tesis de licenciatura. Universidad Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila.
- Cilia, G., Bertelloni, F., Albin, S. and Fratini, F. 2021. Insight into the Epidemiology of Leptospirosis: A Review of *Leptospira* Isolations From "Unconventional" Hosts. *Animals*. 11:191.
- Cordova-Robles, N.F. 2019. Leptospirosis and su transmisión zoonótica en trabajadores de explotaciones de ganado bovino. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora.
- Costa, D.F.D., Silva, A.F.d., Brasil, A.W.d.L., Loureiro, A.P.P., Santos, F.A.d., Azevedo, S.S.d., Lilenbaum, W. and Alves, C.J. 2016. Leptospirosis in native mixed-breed sheep slaughtered in a semiarid region of Brazil. *Ciência Rural*. 47.

- Costa, F., Hagan, J.E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M.S., Stein, C., Abela-Ridder, B. and Ko, A.I. 2015. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 9:e0003898.
- Courdurie, C., Le Govic, Y., Bourhy, P., Alexer, D., Pailla, K., Theodose, R., Cesaire, R., Rosine, J., Hochedez, P. and Olive, C. 2017. Evaluation of different serological assays for early diagnosis of leptospirosis in Martinique (French West Indies). *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 11:e0005678.
- Cruz-Romero, A., Alvarado-Esquivel, C., Romero-Salas, D., Alvarado-Félix, Á.O., Sánchez-Montes, S., Hernández-Tinoco, J. and Sánchez-Anguiano, L.F. 2018. Seroepidemiology of *Leptospira* infection in backyard pigs in Durango State, Mexico. *European Journal of Microbiology and Immunology*. 8:87-90.
- Dewes, C., Fortes, T.P., Machado, G.B., Pacheco, P.S., Silva, J.P.M., Neto, A.C.P.S., Félix, S.R. and da Silva, É.F. 2020. Prevalence and risk factors associated with equine leptospirosis in an endemic urban area in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Development*. 6:58380-58390.
- Dhewantara, P.W., Mamun, A.A., Zhang, W.Y., Yin, W.W., Ding, F., Guo, D., Hu, W., Costa, F., Ko, A.I. and Soares Magalhaes, R.J. 2018. Epidemiological shift and geographical heterogeneity in the burden of leptospirosis in China. *Infectious-Diseases of Poverty*. 7:57.
- Dorsch, R., Ojeda, J., Salgado, M., Monti, G., Collado, B., Tomckowiack, C., Tejada, C., Müller, A., Eberhard, T. and Klaasen, H.L. 2020. Cats shedding pathogenic *Leptospira* spp.—An underestimated zoonotic risk? *PLoS one*. 15:e0239991.
- Dos Santos, L.F., Guimarães, M.F., de Souza, G.O., da Silva, I.W.G., Santos, J.R., Azevedo, S.S., Labruna, M.B., Heinemann, M.B. and Horta, M.C. 2017. Seroepidemiological survey on *Leptospira* spp. infection in wild and domestic mammals in two distinct areas of the semi-arid region of northeastern Brazil. *Tropical animal health and production*. 49:1715-1722.
- Ellis, W.A. 2015. Animal leptospirosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 387:99-137.
- Fávero, J.F., Fritzen, A., Lovato, L.T., Martins, P., Baldissera, M.D., Stefani, L.M. and Da Silva, A.S. 2018. Immune response of a commercial vaccine against *Leptospira interrogans*: antibodies and cytokine levels. *Microbial pathogenesis*. 114:46-49.
- Ferreira, A.S., Costa, P., Rocha, T., Amaro, A., Vieira, M.L., Ahmed, A., Thompson, G., Hartskeerl, R.A. e Inácio, J. 2014. Direct detection and differentiation of pathogenic *Leptospira* species using a multi-gene targeted real time PCR approach. *PLoS One*. 9:e112312.
- Flores, D.M., Flores, L.M., Romanielo, A.F.R., Dutra, G.S., Souza, A.V., Finta, A.L.N., de Lima, D.K.F. and de Sousa Machado, L.C. 2020. Epidemiologia da Leptospirose no Brasil 2007 a 2016. *Brazilian Journal of Health Review*. 3:2675-2680.
- Galarde-López, M., Bobadilla-del Valle, M., Sánchez-Zamorano L.M., Ordaz-Vázquez, A., Velazquez-Meza, M.E., Soberanis-Ramos, O. 2021. High exposure to pathogenic leptospires by the population residing in dairy farms in Hidalgo, Mexico. *Brazilian Journal of Microbiology*. 52:1013-1019.
- Galloway, R.L., Schafer, I.J. and Stoddard, R.A. 2019. Travel-Related Infectious Diseases: Leptospirosis. En: *CDC yellow book 2020:Health information for international travel*. Brunette, G.W. and Nemhauser, J.B. (Eds.), Oxford University Press, New York.
- Garba, B., Bahaman, A.R., Bejo, S.K., Zakaria, Z., Mutalib, A.R. and Bande, F. 2018. Major epidemiological factors associated with leptospirosis in Malaysia. *Acta Tropica*. 178:242-247.
- Gaytán-Camarillo, F., Rico-Chávez, O., Palomares-Resendiz, E.G., Gutiérrez-Hernández, J.L., Díaz-Aparicio, E. and Herrera-López, E. 2021. Spatial autocorrelation and co-occurrence of six serovarieties of *Leptospira* in goat herds of the State of Guanajuato, Mexico. *Brazilian Journal of Microbiology*. 1-8.
- González, H. and Macías, A. 2017. Agrifood Vulnerability and Neoliberal Economic Policies in Mexico. *Review of Agrarian Studies*. 7:72-106.
- Grassmann, A., Souza, J. and McBride, A. 2017. A Universal Vaccine against Leptospirosis: Are We Going in the Right Direction? *Frontiers in Immunology*. 8:256.
- Guglielmini, J., Bourhy, P., Schiettekatte, O., Zinini, F., Brisse, S., Picaudeau, M. 2019. Genus-wide *Leptospira* core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance. *PLoS Negl Trop Dis* 13(4):e0007374. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007374>.
- Haake, D.A. and Levett, P.N. 2015. Leptospirosis in humans. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 387:65-97.
- Hamond, C., Pinna, A., Martins, G. and Lilenbaum, W. 2014. The role of leptospirosis in reproductive disorders in horses. *Tropical Animal Health and Production*. 46:1-10.
- Harrison, N. and Fitzgerald, W. 1988. Leptospirosis—can it be a sexually transmitted disease? *Postgraduate Medical Journal*. 64:163.
- Hartskeerl, P. and Terpstra, W. 1996. Leptospirosis in wild animals. *Veterinary Quarterly*. 18:149-150.
- Hartskeerl, R.A. and Smythe, L.D. 2015. The role of leptospirosis reference laboratories. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 387:273-288.
- Hernández-Ramírez, C., Gaxiola-Camacho, S., Osuna-Ramírez, I., Enríquez-Verdugo, I., Castro, N. and López-Moreno, H. 2017. Prevalence and risk factors associated with serovars of *Leptospira* in dogs from Culiacan, Sinaloa. *Veterinaria México*. 4:1-12.
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L. and Daszak, P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 451:990-993.
- Jorge, S., Schuch, R.A., de Oliveira, N.R., da Cunha, C.E.P., Gomes, C.K., Oliveira, T.L., Rizzi, C., Qadan, A.F., Pacce, V.D. and Recuero, A.L.C. 2017. Human and animal leptospirosis in Southern Brazil: A five-year retrospective study. *Travel medicine and infectious disease*. 18:46-52.
- Kamath, R., Swain, S., Pattanshetty, S. and Nair, N.S. 2014. Studying risk factors associated with human leptospirosis. *Journal of Global Infectious Diseases*. 6:3-9.
- Katz, A.R., Buchholz, A.E., Hinson, K., Park, S.Y. and Efler, P.V. 2011. Leptospirosis in Hawaii, USA, 1999–2008. *Emerging Infectious Diseases*. 17:221.
- Ko, A.I., Goarant, C. and Picaudeau, M. 2009. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. 7:736-747.

- Koizumi, N. and Watanabe, H. 2005. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. *Journal of Postgraduate Medicine*. 51:210-214.
- Lau, C.L., Smythe, L.D., Craig, S.B. and Weinstein, P. 2010. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 104:631-638.
- Leal-Castellanos, C.B., Garcia-Suarez, R., Gonzalez-Figueroa, E., Fuentes-Allen, J.L. and Escobedo-de la Penal, J. 2003. Risk factors and the prevalence of leptospirosis infection in a rural community of Chiapas, Mexico. *Epidemiology and Infection*. 131:1149-1156.
- Levett, P.N. 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 14:293-326.
- Levett, P.N. 2004. Leptospirosis: a forgotten zoonosis? *Clinical and Applied Immunology Reviews*. 4:435-448.
- Levett, P.N. 2015. Systematics of leptospiraceae. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 387:11-20.
- Levett, P.N. and Haake, D.A. 2014. *Leptospira* species (leptospirosis). En: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Bennett, J.E., Dolin, R. and Blaser, M.J. (Eds.), 2714-2720.e2712. Elsevier Health Sciences.
- Loureiro, A.P. and Lilenbaum, W. 2020. Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. *Theriogenology*. 141:41-47.
- Luna, A., Moles, C., Gavaldón, R., Nava, V. and Salazar, G. 2008. La leptospirosis canina y su problemática en México. *Revista de Salud Animal*. 30:01-11.
- Matsuo, K., Isogai, E. and Araki, Y. 2000. Control of immunologically crossreactive leptospiral infection by administration of lipopolysaccharides from a nonpathogenic strain of *Leptospira biflexa*. *Microbiology and Immunology*. 44:887-890.
- Meny, P., Menéndez, C., Ashfield, N., Quintero, J., Rios, C., Iglesias, T., Schelotto, F. and Varela, G. 2019. Seroprevalence of leptospirosis in human groups at risk due to environmental, labor or social conditions. *Revista Argentina de Microbiología*. 51:324-333.
- Miraglia, F., de Morais, Z.M., Dellagostin, O.A., Seixas, F.K., Freitas, J.C., Zacarias, F.G., Delbem, Á.C., Ferreira, T.S., Souza, G.O. and Hartskeerl, R.A. 2012. Molecular and serological characterization of *Leptospira interrogans* serovar Canicola isolated from dogs, swine, and bovine in Brazil. *Tropical Animal Health and Production*. 45:117-121.
- Miraglia, F., Moreno, A.M., Gomes, C.R., Paixão, R., Liuson, E., Morais, Z.M., Maiorka, P., Seixas, F.K., Dellagostin, O.A. and Vasconcellos, S.A. 2008. Isolation and characterization of *Leptospira interrogans* from pigs slaughtered in São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39:501-507.
- Mohan, A.R., Cumberbatch, A., Adesiyun, A.A. and Chadee, D.D. 2009. Epidemiology of human leptospirosis in Trinidad and Tobago, 1996-2007: a retrospective study. *Acta-Tropica*. 112:260-265.
- Moreira, J., Bressan, C.S., Brasil, P. and Siqueira, A.M. 2018. Epidemiology of acute febrile illness in Latin-America. *Clinical Microbiology and Infection*. 24:827-835.
- Murillo, A., Goris, M., Ahmed, A., Cuenca, R. and Pastor, J. 2020. Leptospirosis in cats: Current literature review to guide diagnosis and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 22:216-228.
- Noguchi, H. 1918. The Survival of *Leptospira* (Spirochaeta) Icterohaemorrhagiae in Nature; Observations Concerning Microchemical Reactions and Intermediary Hosts. *The Journal of Experimental Medicine*. 27:609-625.
- Norma oficial mexicana NOM-029-SSA2-1999, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de la leptospirosis en el humano. [Consultado 20 Febrero 2021] 1999. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/029ssa29.html>.
- Oliveira, M.A.A., Leal, É.A., Correia, M.A., Serufo Filho, J.C., Dias, R.S. and Serufo, J.C. 2017. Human leptospirosis: occurrence of serovars of *Leptospira* spp. in the state of Minas Gerais, Brazil, from 2008 to 2012. *Brazilian Journal of Microbiology*. 48:483-488.
- OMS. 2008. Guía para el diagnóstico, vigilancia y control. Serie de manuales técnicos 12. Rio de Janeiro. Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud.
- Orlando, S.A., Perez, A., Sanchez, E., de la Cruz, C., Rugel, O. and Garcia-Bereguain, M.A. 2020. High seroprevalence of anti-*Leptospira* spp. antibodies in domestic and wild mammals from a mixed use rescue center in Ecuador: Lessons for "One Health" based conservation strategies. *One Health*. 10:100140.
- Ortega-Pacheco, A., Gutiérrez-Blanco, E., Cauich-Mendez, W. and Jimenez-Coello, M. 2020. *Leptospira* spp. in cats from tropical Mexico. *Journal of Zoonotic Diseases*. 4:1-8.
- Ospina-Pinto, M.C., Rincón-Pardo, M., Soler-Tovar, D. and Hernández-Rodríguez, P. 2019. Alteration of the Reproductive Indicators by the Presence of *Leptospira* spp. in Sows of Swine Farms. *Acta Scientiae Veterinariae*. 47.
- Pedroza-Perez, D. 2008. Prevalencia de leptospirosis en ganado bovino productor de carne en el estado de Sonora. Publicación Técnica No. 3. Campo Experimental Costa de Hermosillo (INIFAP). Impresos Justo a Tiempo, S.A. de C.V. México.
- Pereira, M., Schneider, M., Munoz-Zanzi, C., Costa, F., Benschop, J., Hartskeerl, R., Martinez, J., Jancloes, M. and Bertherat, E. 2018. A road map for leptospirosis research and health policies based on country needs in Latin-America. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 41:e131.
- Petrakovsky, J., Tinao, J. and Esteves, J. 2013. Leptospirosis porcina: prevalencia serológica en establecimientos productores de la República Argentina. *Revista MVZ Córdoba*. 18:3282-3287.
- Pinto Pda, S., Libonati, H., Penna, B. and Lilenbaum, W. 2016. A systematic review on the microscopic agglutination test seroepidemiology of bovine leptospirosis in Latin-America. *Trop Anim Health Prod*. 48:239-248.
- Pratt, N. and Rajeev, S. 2018. *Leptospira* seroprevalence in animals in the Caribbean region: A systematic review. *Acta tropica*. 182:34-42.
- Pulido-Villamarín, A., Carreño-Beltrán, G., Mercado-Reyes, M. and Ramírez-Bulla, P. 2014. Situación epidemiológica de la leptospirosis humana en Centroamérica, Suramérica y el Caribe. *Universitas Scientiarum*. 19:247-264.
- Putz, E.J. and Nally, J.E. 2020. Investigating the Immunological and Biological Equilibrium of Reservoir Hosts and Pathogenic *Leptospira*: Balancing the Solution to an Acute Problem? *Frontiers in Immunology*. 11:2005.
- Rahman, M.H.A.A., Hairon, S.M., Hamat, R.A., Jamaluddin, T.Z.M.T., Shafei, M.N., Idris, N., Osman, M., Sukeri, S., Wahab,

- Z.A. and Mohammad, W.M.Z.W. 2018. Leptospirosis health intervention module effect on Knowledge, attitude, belief, and practice among wet market Workers in Northeastern Malaysia: an intervention study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 15:1396.
- Rajakpase, S., Rodrigo, C., Handunnetti, S.M. and Fernando, S.D. 2015. Current immunological and molecular tools for leptospirosis: diagnostics, vaccine design, and biomarkers for predicting severity. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 14:2.
- Richard, S. and Oppliger, A. 2015. Zoonotic occupational diseases in forestry workers - Lyme borreliosis, tularemia and leptospirosis in Europe. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 22:43-50.
- Rivera-Benitez, J., Rosas-Estrada, K., Pulido-Camarillo, E., de la Peña-Moctezuma, A., Castillo-Juárez, H. and Ramírez-Mendoza, H. 2014. Serological Survey of Veterinarians to Assess the Zoonotic Potential of Three Emerging Swine Diseases in Mexico. *Zoonoses and Public Health*. 61:131-137.
- Rodríguez, Y., Echeverría, E., Rodríguez, J., Valdés, Y., Rodríguez, I. and Obregón, A.M. 2018. *Leptospira* Serovars Circulating in Eastern Region of Cuba, from 2007 to 2012. *Journal of Veterinary Medicine and Research*.
- Rodríguez-Parra, M., Bocanegra-arcía, V., Acosta-González, R., García-Oropesa, E., Bocanegra-Alonso, A. and Flores-Gutiérrez, G. 2009. Seropositividad a *Leptospira* en trabajadores de rastros de Tamaulipas. *Bioquímica*. 34:92.
- Samsudin, S., Sakinah, S., Malina, O., Norliza, B., Noh, M., Fairuz, A., Jamaluddin, T., Hamat, R., Zahiruddin, W. and Mohd Nazri, S. 2018. Seroprevalence of leptospiral antibodies among market workers and food handlers in the central state of Malaysia. *Tropical Medicine & International Health*. 23:327-333.
- Sanchez-Montes, S., Espinosa-Martinez, D.V., Rios-Munoz, C.A., Berzunza-Cruz, M. and Becker, I. 2015. Leptospirosis in Mexico: Epidemiology and Potential Distribution of Human Cases. *PLoSOne*. 10:e0133720.
- Sanhueza, J.M., Heuer, C., Wilson, P.R., Benschop, J. and Collins-Emerson, J.M. 2017. Seroprevalence and Risk Factors for *Leptospira* Seropositivity in Beef Cattle, Sheep and Deer Farmers in New Zealand. *Zoonoses Public Health*. 64:370-380.
- Schneider, M.C., Leonel, D.G., Hamrick, P.N., Caldas, E.P.d., Velásquez, R.T., Paez, F.A.M., Arrebato, J.C.G., Gerger, A., Pereira, M.M. and Aldighieri, S. 2017. Leptospirosis in Latin-America: exploring the first set of regional data. *Revista-Panamericana de Salud Pública*. 41:e81.
- Sehgal, S., Sugunan, A., Murhekar, M., Sharma, S. and Vijayachari, P. 2000. Randomized controlled trial of doxycycline prophylaxis against leptospirosis in an endemic area. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 13:249-255.
- Sequeira, J., Jiménez, M., Araya, L., Avalos, J. and Oviedo, M. 2016. Seroprevalencia de *Leptospira* spp. en ganado bovino lechero de la región Huetar Norte de Costa Rica. *Revista Ciencias Veterinarias*. 34:23.
- Shaked, Y., Shpilberg, O., Samra, D. and Samra, Y. 1993. Leptospirosis in pregnancy and its effect on the fetus: case report and review. *Clinical Infectious Diseases*. 17:241-243.
- Shiokawa, K., Welcome, S., Kenig, M., Lim, B. and Rajeev, S. 2019. Epidemiology of *Leptospira* infection in livestock species in Saint Kitts. *Tropical animal health and production*. 51:1645-1650.
- Sonnier, C., Branger, C., Michel, V., Ruvoen-Clouet, N., Ganiere, J. and Andre-Fontaine, G. 2000. Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. *Vaccine*. 19:86-94.
- Stackebrandt, E., Chertkov, O., Lapidus, A., Nolan, M., Lucas, S., Hammon, N., Deshpande, S., Cheng, J.F., Tapia, R., Goodwin, L.A., Pitluck, S., Liolios, K., Pagani, I., Ivanova, N., Mavromatis, K., Mikhailova, N., Huntemann, M., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Pan, C., Rohde, M., Gronow, S., Goker, M., Detter, J.C., Bristow, J., Eisen, J.A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Woyke, T., Kyrpides, N.C. and Klenk, H.P. 2013. Genome sequence of the free-living aerobic spirochete *Turneriella parva* type strain (H(T)), and emendation of the species *Turneriella parva*. *Standards in Genomic Sciences*. 8:228-238.
- Suepaul, S., Carrington, C., Campbell, M., Borde, G. and Adesiyun, A. 2010. Serovars of *Leptospira* isolated from dogs and rodents. *Epidemiology & Infection*. 138:1059-1070.
- Taddei, S., Moreno, G., Cabassi, C.S., Schiano, E., Spadini, C. and Cavirani, S. 2021. *Leptospira* Seroprevalence in Colombian Dairy Herds. *Animals*. 11:785.
- Tan, W.L., Soelar, S.A., Mohd Suan, M.A., Hussin, N., Cheah, W.K., Verasahib, K. and Goh, P.P. 2016. Leptospirosis Incidence and Mortality in Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 47:434-440.
- Thibeaux, R., Geroult, S., Benezech, C., Chabaud, S., Soupe-Gilbert, M.E., Girault, D., Bierque, E. and Goarant, C. 2017. Seeking the environmental source of Leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 11:e0005414.
- Thiermann, A.B. 1982. Experimental leptospiral infections in pregnant cattle with organisms of the Hebdomadis serogroup. *American Journal of Veterinary Research*. 43:780-784.
- Vado-Solís, I.A., Cárdenas-Marrufo, M.F., Pérez-Osorio, C.E., Jiménez-Delgadillo, B., Arias-León, J.J. and Peniche-Lara, F. 2014. Leptospirosis: una enfermedad ocupacional en trabajadores que conviven con bovinos seropositivos en el estado de Yucatán. *Ciencias Humanismo Salud*. 1:4-13.
- Valença, R., Mota, R., Castro, V., Anderlini, G., Pinheiro Junior, J., Brandespim, D., Valença, S. and Guerra, M. 2013. Prevalence and risk factors associated with *Leptospira* spp. infection in technified swine farms in the state of Alagoas, Brazil risk factors associated with *Leptospira* spp. in swine farms. *Transboundary and emerging diseases*. 60:79-86.
- Velasco-Castrejón, O., Rivas-Sánchez, B., Sánchez-Spíndola, M.E., Soriano, J., Rivera-Reyes, H.H. and Sebles, V.G. 2009. Leptospirosis crónica en México. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*. 56:157-167.
- Vieira, A.S., Pinto, P.S. and Lilenbaum, W. 2018. A systematic review of leptospirosis on wild animals in Latin-America. *Tropical animal health and production*. 50:229-238.
- Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, Thibeaux R, et al. (2019) Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl Trop Dis* 13(5):e0007270. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>
- Vinod Kumar, K., Lall, C., Vimal Raj, R., Vedhagiri, K. and Vijayachari, P. 2016. Molecular detection of pathogenic leptospiral protein encoding gene (lipL32) in environmental aquatic biofilms. *Letters in applied microbiology*. 62:311-315.

- Waggoner, J.J. and Pinsky, B.A. 2016. Molecular diagnostics for human leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 29:440-445.
- WHO. 2002. Occupational health: a manual for primary health care workers. No. WHO-EM/OCH/85/E/L. World Health Organization Regional Office for the Eastern Mediterranean, Cairo, Egypt.
- WHO. 2009. Leptospirosis Situation in the WHO South-East Asia Region. World Health Organization Regional office for South-East Asia. 7:2011.
- Wynwood, S.J., Graham, G.C., Weier, S.L., Collet, T.A., McKay, D.B. and Craig, S.B. 2014. Leptospirosis from water sources. *Pathogens and Global Health*. 108:334-338.
- Yasuda, P.H., Steigerwalt, A.G., Sulzer, K.R., Kaufmann, A.F., Rogers, F. and Brenner, D.J. 1987. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new *Leptospira* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 37:407-415.
- Yescas-Benitez, J.E., Rivero-Perez, N., Montiel-Díaz, H.E., Valladares-Carranza, B., Pelaez-Acero, A., Morales-Ubaldo, A.L. and Zaragoza-Bastida, A. 2020. Comportamiento-Epidemiológico de Leptospirosis en México durante periodo 2012-2018. *Revista Salud Pública*. 22:1-5.
- Zárate-Martínez, J., Rosete-Fernández, J., Ríos-Utrera, A., Barradas-Piña, F. and Olazarán-Jenkins, S. 2015. Prevalence of leptospirosis and its relationship with pregnancy rate in cattle from the central zone of Veracruz. *NovaScientia*. 7:202-217.
- Zavala-Velázquez, J.E., Vado-Solís, I.A., Rodríguez-Félix, M.E., Rodríguez-Angulo, E.M., Barrera-Pérez, M.A. and Guzman-Marín, E.d.S. 1998. Leptospirosis anictérica en un brote epidémico de dengue en la Península de Yucatán. *Revista Biomedica*. 9:78-83.



Metabolite profiling and antioxidant capacity of lettuce *Lactuca sativa* var. longifolia grown in an aquaponic system irrigated with shrimp effluents

Perfil de metabolitos y capacidad antioxidante de lechuga *Lactuca sativa* var. Longifolia en cultivo acuapónico irrigado con efluentes camaronícolas

Humberto Ramos-Sotelo¹, Iza F. Pérez-Ramírez², Marely G. Figueroa-Pérez³, Juan F. Fierro-Sañudo⁴, Jesús A. León-Cañedo⁴, Suammy G. Alarcón-Silvas⁵, Cuauhtémoc Reyes-Moreno¹, Federico Páez-Osuna^{*6,7}

¹ Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa 80030, Mexico.

² Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la Republica (PROPAC), Centro Universitario, Universidad Autónoma de Querétaro, Mexico.

³ Universidad Tecnológica de Culiacán. Culiacán Sinaloa 80014, Mexico.

⁴ Posgrado en Ciencias Agropecuarias, Colegio de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa 80000, Mexico.

⁵ Posgrado en Ciencias en Recursos Acuáticos, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, Sinaloa 82017, Mexico.

⁶ Unidad Académica Mazatlán, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Joel Montes Camarena s/n, Playa Sur, Mazatlán, Sinaloa 82040, Mexico.

⁷ El Colegio de Sinaloa. Antonio Rosales 435 Pte. Culiacán, Sinaloa, Mexico.

ABSTRACT

This paper focuses on the quality of lettuce var. *longifolia* in an aquaponic culture grown with shrimp effluents from well water (WW, salinity 1.7 g L⁻¹), diluted seawater (DSW, salinity 1.7 g L⁻¹), and a hydroponic solution (HS, salinity 1.4 g L⁻¹) as control. Results evidenced that WW and DSW effluents slightly decreased plants weight, foliage, and yield (5 - 9%) compared to HS control. Furthermore, WW-lettuce showed higher levels of total phenolic compounds (~71%), flavonoids (~90%), as well as antioxidant capacity (0.7-3-folds) than HS-plants, mainly in the soluble fraction. WW-lettuce also showed a higher content of total soluble solids (~16%) and, a lower saturation of color. WW-lettuce exhibited the highest concentrations of p-hydroxybenzoic, p-coumaric and ferulic acids, as well as quercetin 3-O-glucoside and quercetin 3-O-ramnoside, whereas DSW-lettuce showed the highest levels of caffeic acid, isorhamnetin 3-O-glucoside, kaempferol 3-O-glucoside, kaempferol and quercetin. HS-lettuce showed a higher proline content than lettuces from the other treatments. These results indicate that aquaponic lettuce culture with shrimp effluent from WW could be used as an alternative culture system to reduce land area requirements, decrease or eliminate the discharge and impact of shrimp effluents, and simultaneously improve the functional properties of lettuce.

Keywords: Shrimp; *Litopenaeus vannamei*; Shrimp farming; Aquaponics

RESUMEN

Este estudio evalúa la calidad de la lechuga var. *longifolia* en un cultivo acuapónico irrigado con efluentes camaronícolas de agua de pozo (WW, salinidad 1.7 g L⁻¹),

agua de mar diluida (DSW, salinidad 1.7 g L⁻¹) y una solución hidropónica (HS, salinidad 1.4 g L⁻¹) como control. Los resultados mostraron que WW y DSW disminuyen ligeramente el peso, follaje y rendimiento (5-9%) en las plantas comparado con HS. La lechuga-WW mostró un nivel superior de fenólicos totales (~71%), flavonoides (~90%) y capacidad antioxidante (0.7-3-veces) que las plantas-HS, principalmente en la fracción soluble. La lechuga WW mostró un contenido mayor de sólidos solubles totales (~16 %) y, menor saturación de color. La lechuga-WW exhibió las concentraciones más altas de ácidos p-hidroxibenzoico, p-cumárico y ferúlico, así como de quercetina 3-O-glucósido y quercetina 3-O-ramnósido. Mientras que la lechuga-DSW mostró las concentraciones más altas de ácido cafeico, isorhamentina 3-O-glucosido, kaempferol 3-O-glucosido, kaempferol y quercetina. La lechuga-HS mostró mayor contenido de prolina. Estos resultados indican que el cultivo acuapónico con efluente camaronícola-WW puede ser usado como una alternativa para reducir los requerimientos de suelo, decrecer o eliminar la descarga e impacto de los efluentes camaronícolas, y simultáneamente mejorar las propiedades funcionales de la lechuga.

Palabras clave: Camarón; *Litopenaeus vannamei*; Cultivo de camarón; Acuaponia

INTRODUCTION

There is an increasing interest in the development of new agriculture methods for sustainable food production, given traditional agriculture requires a huge expense of water and land space (Ramos-Sotelo *et al.*, 2019). Besides, shrimp farming also uses a large water amount, due to the constant exchanges for maintain an adequately sustain and quality for shrimp growth. Moreover, shrimp farming produces a

*Autor para correspondencia: Federico Páez-Osuna
Correo electrónico: paezos@ola.icmyl.unam.mx

Recibido: 09 de Marzo de 2021
Aceptado: 04 de Agosto de 2021

constant discharge of effluents with high concentrations of organic matter and nutrients that deteriorate the water quality of aquatic ecosystems, in which these effluents are discarded (Páez-Osuna 2001). Therefore, the integration of shrimp farming with agriculture through the irrigation of plants with these effluents could be a sustainable option for food production, as well as for the mitigation of environmental negative effects of both shrimp farming and traditional agriculture (Fierro-Sañudo *et al.*, 2020).

On the other hand, the use of shrimp culture effluents in agriculture represents an alternative source of nutrients for plant cultivation, which allows the reduction of the fertilizer dosage. Furthermore, aquaponics involves plant cultivation without soil by using only water and dissolved nutrients, which have many advantages including faster plant growth, high productivity, easy handling, and greater efficiency in water use. However, there are also disadvantages in terms of the crops, such as adverse effects due to salinity, and an excess or deficiency of nutrients (Fierro-Sañudo *et al.* 2020). Low-salinity effluents (1 – 10 g L⁻¹) from shrimp farming have available nutrients (Fierro-Sañudo *et al.*, 2020), which make them viable to grow plants, such as lettuce in salinities <2 g L⁻¹ (León-Cañedo *et al.*, 2019). Nonetheless, the critical question is whether such shrimp effluents produce lettuce with a quality comparable to that by traditional hydroponic solutions.

Due to its tolerance to salt stress, the cultivation of lettuce (*L. sativa* L.) could be integrated with shrimp aquaponic systems. In addition, it has been shown that when plants are exposed to some types of abiotic stress during cultivation, such as salinity or nutrient deficiency, their defense mechanism is activated, which involves an increase in compounds with antioxidant properties which leads to an increase in their nutraceutical properties (Sharma *et al.*, 2019). This has been proved in different varieties of *Lactuca sativa* L, in which salt stress resulted in an increase of the total phenolic compounds, flavonoids, and in antioxidant activity, improving the quality of the crop at 5.8 g L⁻¹ (Ouhibi *et al.*, 2014). Therefore, the variability in the composition and quantity of phytochemicals in lettuce indicate the importance of selecting certain types and characteristics of the water used for irrigation.

In a first study (Ramos-Sotelo *et al.*, 2019), we showed that lettuce *L. sativa* var. Tropicana M1 grows reasonably well when irrigated with shrimp effluents, and that polyphenols and flavonoid content are even better in the plant produced with well and diluted seawater shrimp effluents. In the present study, the antioxidant properties and production variables of *L. sativa* var. *longifolia* were examined, and additionally, metabolite profiling was evaluated. The hypothesis is that the *L. sativa* var. *longifolia* lettuce grown with low salinity shrimp effluents exhibits an enhanced quality compared to a commercial hydroponic solution. Therefore, this study evaluated the performance of a hydroponic lettuce culture of the *longifolia* variety grown with a deep flow technique (DFT) hydroponic system with two low-salinity shrimp

effluents (well and diluted seawater, both at 2.7 dS m⁻¹). The performance parameters measured were the concentrations of chlorophyll, proteins, lipids, carbohydrates, flavonoids, proline, total and individual phenolic compounds, and antioxidant capacity of the harvested lettuce. The importance of these parameters resides in that they are key indicators to evaluate the nutritional quality of the plants grown with the shrimp effluent in comparison with the HS control.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted in the YK Experimental Module in Mazatlan, Sinaloa, Mexico (23° 12' 11.9" N; 106° 25' 41.29" W). The aquaponic system consisted of six tanks of 3.14 m³ with two different shrimp cultures both with a salinity of 1.7 g L⁻¹, three tanks for each one (Ramos-Sotelo *et al.*, 2019): (i) effluent of shrimp grown in well water (treatment WW) and (ii) effluent of shrimp grown in diluted seawater (treatment DSW). Also, one hydroponic DFT system in triplicate was constructed to grow lettuce using a nutritive solution (HS) as control. Plants of *Lactuca sativa* L. var. *longifolia* seedlings were transplanted to their respective treatment 30 days after sowing, and were coupled with tanks of shrimp culture after 50 days of growth. Subsequently, plants were harvested, and both roots and foliage tissues were weighed to estimate production variables. The characterization of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) effluents from both WW and DSW treatments was according to Ramos-Sotelo *et al.* (2019).

Total soluble solids (TSS), pH, titration acidity (TA), chlorophyll (a and b), protein, carbohydrate, and fat contents were quantified according to the AOAC (1997). Color was measured by reflectance in leaves in a portable Minolta CM-2002 spectrophotometer (precision was 9.6 %). Free proline was evaluated colorimetrically (Bates *et al.*, 1973) (precision 3.9 %) and results expressed in mg g⁻¹ dry weight (dw). To extract the soluble fraction compounds (using methanol:water 80:20), and the phenolic compounds from the insoluble fraction (alkaline hydrolysis, ethyl acetate and methanol:water 80:20), samples were processed according to Nguyen and Niemeyer (2008) and Mora-Rochin *et al.* (2010), respectively. Total phenolic content (TPC) was determined by colorimetric assay, and expressed as gallic acid equivalent g⁻¹ dry sample (GAE/g) (precision 5.1 %). Total flavonoid content (TFC) was determined by colorimetric assay (Kim *et al.*, 2003), and expressed as mg of catechin equivalents g⁻¹ dry lettuce (precision 4.9 %). Antioxidant capacity assay for 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) and for 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay was quantified as described by Arnao *et al.* (2001) and Brand-Williams *et al.* (1995), respectively. Results were expressed in mg of Trolox equivalents g⁻¹ dry lettuce (precision 5.0 %). The polyphenol profile was assessed by ultra-performance liquid chromatography coupled to a quadrupole-time of flight, with an atmospheric pressure electrospray ionization interphase (Vion, Waters Co, MA, USA) and a photodiode detector array. The procedure and the mass spectrometry conditions are described in Covarrubias-Cárdenas *et al.* (2018) (precision

was 2.2 %).

The data were subjected to the Shapiro-Wilk test, to check the normality. Data were analyzed using the software JMP ver. 10.0.0 (Copyright © 2012 SAS Institute Inc.) by non-parametric one-way Kruskal-Wallis test. Comparisons for each pair were made using the Wilcoxon method performed at a significance level of $P < 0.05$, and a 95% confidence limit to establish the significant difference between the mean parameters for the two treatments (WW and DSW) and the HS control.

RESULTS AND DISCUSSION

In general, both shrimp effluents exhibited similar physicochemical values (pH 7.0 ± 0.3 , 6.7 ± 0.2 , 6.1 ± 0.0 ; temperature 19.3 ± 1.3 , 19.6 ± 2.1 , 21.6 ± 1.9 °C; EC 2.6 ± 0.3 , 2.8 ± 0.4 , 2.3 ± 0.3 dS m^{-1} ; and dissolved oxygen 7.6 ± 0.4 , 7.5 ± 0.3 , 7.1 ± 0.1 mg L^{-1} for WW, DSW and HS control, respectively) and elemental compositions (major ions and nutrients). The concentrations of Cl^- in both WW (669 ± 45 mg L^{-1}) and DSW (620 ± 34 mg L^{-1}) shrimp effluents were high in comparison to those specified (355 mg L^{-1}) as restriction limits for irrigation (León-Cañedo *et al.*, 2019). At the end of the lettuce crop cycle, the total biomass produced as edible tissue showed a production trend $HS > WW > DSW$ for individual weight, number of leaves and yield (Table 1). These differences could be associated with lower levels of nutrients and high level of Cl^- in DSW. Al-Maskri *et al.* (2010) found similar results in the number of leaves, fresh plant and dry weight of lettuce, with a significant reduction as the salinity increases (2.9 and 5.8 g L^{-1}), which may be attributed to the osmotic stress and nutritional disorders. However, it is important to ponder that the percentage of decrease was 8-10 %.

The results of the leaves color analysis indicated that lettuce irrigated with DSW and WW effluents showed significant decreases in both parameters (L and C) on the CIELAB scale in comparison to the HS control. These changes were higher in the WW treatment (Table 2). The color of the leaves was modified gradually from vivid green, to dull green in plants exposed to both types of effluents (Table 2). This

Table 1. Growth parameters (mean \pm SD) of lettuce cultured with shrimp effluents WW, DSW, and a hydroponic solution (HS).

Tabla 1. Parámetros de crecimiento (promedio \pm SD) de lechuga cultivada con efluente camarónicola WW, DSW, y una solución hidropónica HS.

Parameter	WW*	DSW**	HS***
Individual weight (g)	224.9 \pm 7.9 ^b	193.8 \pm 9.6 ^c	234.8 \pm 7.1 ^a
Number of leaves	21.9 \pm 1.4 ^b	17.8 \pm 1.0 ^c	23.8 \pm 1.1 ^a
Yield (g/plant)	29.3 \pm 0.9 ^b	25.2 \pm 0.7 ^c	31.5 \pm 1.1 ^a

Data are mean values \pm SD, (n=9); for the same line (parameter), means with different letters between columns are significantly different ($p < 0.05$). Statistical analyses performed by one-way Kruskal-Wallis test.

* Effluent of shrimp grown in well water (treatment WW).

** Effluent of shrimp grown in diluted seawater (treatment DSW).

***Hydroponic DFT system to grow lettuce using a nutritive solution (HS) as control.

Table 2. Acidity (TA), pH, total soluble solid content (TSS), color L (lightness), C (chroma) and proximate analysis (% on fresh weight) (mean \pm SD) of lettuce cultured with shrimp effluents WW, DSW, and the HS control treatment.

Tabla 2. Acidez, pH, sólidos solubles totales (SST), color L, C y análisis proximal (% en base peso húmedo) (promedio \pm SD) de lechuga cultivada con efluente camarónicola WW, DSW y el control HS.

	WW*	DSW**	HS***
pH	6.05 \pm 0.04 ^b	6.03 \pm 0.07 ^b	6.10 \pm 0.04 ^a
TA	0.12 \pm 0.01 ^a	0.13 \pm 0.01 ^a	0.12 \pm 0.02 ^a
TSS	2.97 \pm 0.53 ^a	2.21 \pm 0.55 ^b	2.54 \pm 0.61 ^b
L	44.23 \pm 5.3 ^c	41.97 \pm 5.1 ^b	42.37 \pm 4.3 ^a
C	28.2 \pm 6.6 ^c	28.73 \pm 2.8 ^b	29.18.3 \pm 4.1 ^a
Moisture	92.16 \pm 2.5 ^a	90.53 \pm 2.7 ^b	90.4 \pm 1.4 ^b
Fat	0.41 \pm 0.02 ^b	0.42 \pm 0.04 ^b	0.46 \pm 0.05 ^a
Ash	0.85 \pm 0.04 ^a	0.79 \pm 0.04 ^b	0.82 \pm 0.06 ^a
Protein	0.95 \pm 0.03 ^c	1.07 \pm 0.11 ^b	1.50 \pm 0.06 ^a
Carbohydrates	4.09 \pm 0.66 ^c	4.51 \pm 0.70 ^b	5.10 \pm 0.78 ^a

Data are mean values \pm SD, (n=9); for the same line, means with different letters between columns are significantly different ($p < 0.05$). Statistical analyses performed by one-way Kruskal-Wallis test.

* Effluent of shrimp grown in well water (treatment WW).

** Effluent of shrimp grown in diluted seawater (treatment DSW).

***Hydroponic DFT system to grow lettuce using a nutritive solution (HS) as control.

may be due to the inhibitory effect of salinity stress over photosynthetic enzymes and the reduced CO_2 in the leaves, caused by stomatal closure (DeRidder and Salvucci, 2007). These results are consistent with reports describing the negative effect of salinity on the green color of vegetables (Garrido *et al.*, 2014). TA was similar for both treatments and the HS control ($P > 0.05$). A small decrease in pH was observed in lettuces irrigated with DSW and WW effluents. In comparison with the HS control, the TSS was higher in lettuce from WW treatments (Table 2). These results agree with those obtained by Magdi *et al.* (2013) for bean plants.

Proximate analysis on the harvested lettuce revealed a general trend $HS > DSW > WW$ for fat, protein, and carbohydrates (Table 2). It has been shown that protein content significantly decreased in plants treated with sodium chloride at low concentrations (Ayala-Astorga and Alcaraz-Meléndez, 2010). One effect of saline stress in plants is the loss of potassium ions through roots, which causes a physiological imbalance, given potassium is essential for protein synthesis. Furthermore, this also affects plant growth and development, and if the stress is prolonged, it could affect protein synthesis and eventually diminish its concentrations (Chen *et al.*, 2007). Carbohydrates were reduced ~ 20 and $\sim 12\%$ in lettuces from WW and DSW treatments, respectively, in comparison to the HS control (Table 2). Such results are consistent with those obtained by Magdi *et al.* (2013), who reported that organic acids, especially sugars, are the main solutes involved in the osmotic adjustment of some plants growing under osmotic and saline stress. Similarly, lipid content decreased in lettuces harvested with WW and DSW treatments in comparison with

the HS control (Table 2). Under salt stress conditions, important changes in lipids metabolism occur in plants, mainly the degradation of the plasmatic membrane due to a reduction in the desaturase activity. Some plants react against the oxidative stress induced by salinity by restructuring membranes and reducing polyunsaturated fatty acid content, which affects the membrane fluidity and restricts the permeability of Na⁺ and Cl⁻ ions (Mehraban *et al.*, 2017).

Figure 1 shows that the total phenolic content increased around 14 and 70% for DSW and WW treatments, respectively, compared to the HS control in the soluble fraction. However, for the insoluble fraction, the content of phenolic compounds was higher in the control plants. Regarding flavonoid content, WW treatment evidenced increases by 2-fold in comparison with the HS control. Conversely, DSW showed no significant differences with the HS control. Calcium deficiency during plant cultivation can induce an increase of secondary metabolites, mainly phenolic compounds (Chishaki and Horiguchi, 1997). It has also been shown that the application of CaCl₂ can lead to an improvement in the retention of phenolic compounds, and the antioxidant capacity for the first seven days in lettuce (Materska *et al.*, 2019). In our previous study (Ramos-Sotelo *et al.*, 2019), it was evidenced that Mg levels in WW (57.5 mg L⁻¹) effluents were significantly higher than in DSW (43.7 mg L⁻¹). It is known that high Mg⁺² levels affect the absorption of Ca⁺² by plants, which could lead to the aforementioned increase of phenolic compounds in WW treatments (Ramos-Sotelo *et al.*, 2019).

Furthermore, results indicated that chlorophyll a and b levels were slightly reduced (~7%) by WW treatment. This effect is related to the results observed in color parameters

for the WW treatment, since chlorophyll is the most important pigment in green vegetables. Reduction in chlorophyll occurs in salt-stressed plants, due to the inhibitory effect on the biosynthesis of the different chlorophyll fractions by the accumulation of major ions. Ion imbalance affects the forces that stabilize the pigment protein liquid complex, in chloroplasts (Acosta-Motos *et al.*, 2017).

The results of this study indicated a reduction of 25 to 44 % in the proline content of plants irrigated with DSW and WW effluents, respectively, compared with the HS control. Shetty (2004) proposed a link between the proline accumulation and the energy transfer to the phenylpropanoids biosynthesis, through the pentose phosphate pathway. Proline synthesis involves the oxidation of NADPH, which feeds the pentose phosphate pathway, providing precursors for phenolic biosynthesis through the shikimic acid pathway. This could explain the proline decrease in plants grown with WW and DSW effluents. Sharma and Ramawat (2013) found increases of up to 40 % in proline content of *Salvadora persica* calluses when applying 50 mM NaCl. However, when 200 mM NaCl were applied in this same study, proline decreased considerably. Conversely, this last treatment with the lowest proline content showed the highest antioxidant capacity, which suggests that this decrease is related to its use as a precursor in the synthesis of compounds with antioxidant potential.

Table 3 shows the specific phenolic compounds, whose concentration was modified in lettuce by the irrigation with shrimp effluents. Sixteen compounds were identified in the soluble fraction and ten in the insoluble fraction. Significantly higher levels of isorhamnetin 3-O-glucoside, quercetin 3-O-glucoside, quercetin 3-O-rhamnoside, dihydroxybenzoic

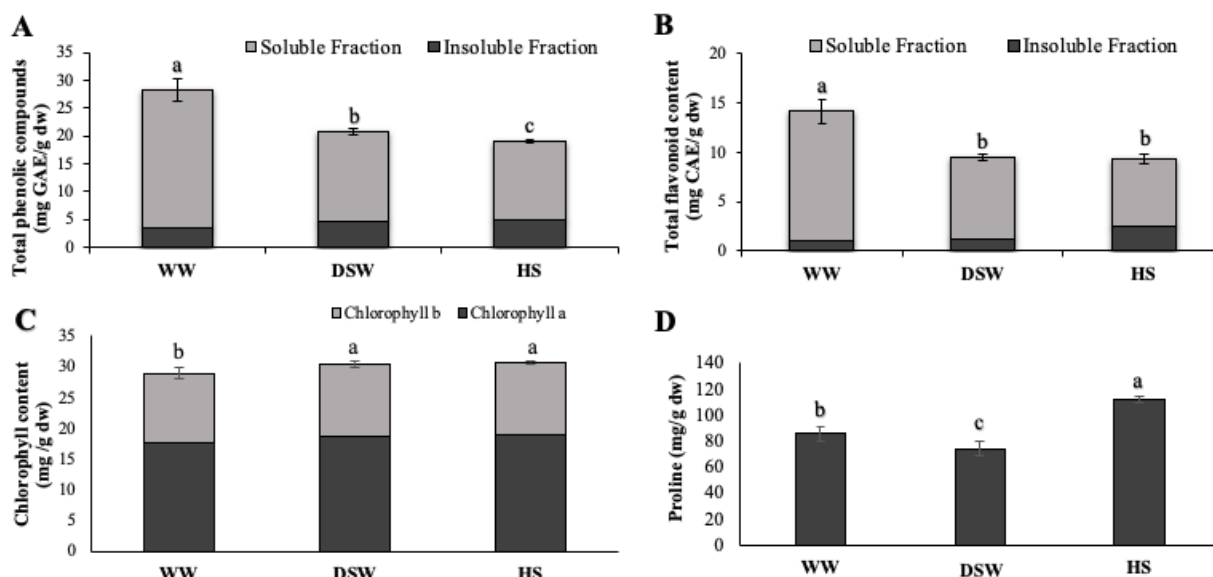


Figure 1. A, Total phenolic; B, flavonoid; C, chlorophyll a and b; and D, proline contents (mean±SD) of lettuce cultured with shrimp effluents from WW, DSW, and the control treatment (HS). Treatments with different letters (a, b, c) indicate significant differences ($p < 0.05$). Statistical analyses performed by a one-way Kruskal-Wallis test.

Figura 1. A, Fenólicos totales; B, flavonoides; C, clorofila a y b; y D, contenido de prolina (promedio ± SD) de lechuga cultivada con efluentes camaronícolas WW, DSW y el control (HS). Tratamientos con diferente letra (a, b, c) indica diferencias significativas ($p < 0.05$). Análisis estadístico efectuado con una prueba de Kruskal-Wallis.

Table 3. Metabolite profiling of soluble and insoluble fractions (mean \pm SD) of lettuce cultured with shrimp effluents from WW, DSW, and the HS control treatment. **Tabla 3.** Perfil de metabolitos de las fracciones soluble e insoluble (promedio \pm SD) de lechuga cultivada con efluentes camaronícolas WW, DSW y el control HS.

RT (min)	Compound	Mass (m/z)	Concentration ($\mu\text{g mg}^{-1}$)					
			Soluble fraction			Insoluble fraction		
			WW	DSW	HS	WW	DSW	HS
1.79	4-O-glucoside of dihydroxybenzoic acid isomer I	315.07	–	–	–	–	0.02 \pm 0.00 ^a	0.02 \pm 0.00 ^a
1.81	Dihydroxybenzoic acid glucoside isomer I	315.07	0.52 \pm 0.48 ^a	1.08 \pm 0.47 ^a	1.07 \pm 0.32 ^a	–	–	–
1.9	Dihydroxybenzoic acid glucoside isomer II	315.07	0.83 \pm 0.15 ^a	1.28 \pm 0.37 ^a	0.81 \pm 0.14 ^a	0.01 ^a	–	–
2.07	Dihydroxybenzoic acid glucoside isomer III	315.07	0.32 \pm 0.03 ^a	0.28 \pm 0.03 ^a	–	–	–	–
2.12	Caffeic acid 4-O-glucoside	341.09	0.34 \pm 0.10 ^a	0.46 \pm 0.01 ^a	0.40 \pm 0.04 ^a	0.23 \pm 0.02 ^b	0.35 \pm 0.00 ^a	0.01 \pm 0.00 ^c
2.38	p-Hydroxybenzoic acid*	137.02	1.9 \pm 1.42 ^a	3.25 \pm 0.36 ^a	2.75 \pm 0.48 ^a	–	–	–
2.49	Isomeric dihydrobenzoic acid II	153.02	–	2.09 \pm 0.13 ^a	0.44 \pm 0.08 ^b	–	–	–
2.55	Isomeric caffeoylquinic acid I	353.09	–	–	–	3.75 \pm 0.02 ^a	0.45 \pm 0.01 ^b	0.02 \pm 0.01 ^c
2.8	Caffeic acid *	179.04	18.09 \pm 5.18 ^c	60.16 \pm 5.82 ^a	43.96 \pm 5.04 ^b	–	–	–
2.97	Benzoic acid	121.03	0.26 \pm 0.01 ^b	0.33 \pm 0.04 ^{ab}	0.36 \pm 0.06 ^a	–	–	–
3.01	p-Coumaroylquinic acid isomer I	337.09	–	–	–	0.12 \pm 0.00 ^a	0.01 \pm 0.00 ^b	–
3.44	p-Coumaric acid *	163.04	3.82 \pm 0.37 ^a	3.49 \pm 0.43 ^a	2.43 \pm 0.28 ^b	–	–	–
3.91	Ferulic acid *	193.05	0.41 \pm 0.07 ^a	0.31 \pm 0.04 ^a	–	–	–	–
4.15	Isorhamnetin 3-O-glucoside	477.07	3.26 \pm 0.60 ^b	5.95 \pm 0.93 ^a	1.12 \pm 0.16 ^c	3.54 \pm 0.15 ^a	0.55 \pm 0.00 ^b	–
4.24	Quercetin 3-O-glucoside	463.09	17.64 \pm 3.15 ^a	13.81 \pm 2.66 ^b	4.19 \pm 0.80 ^c	4.64 \pm 0.20 ^a	1.37 \pm 0.02 ^b	0.04 \pm 0.00 ^c
4.4	Kaempferol 3-O-glucoside	447.09	0.63 \pm 0.08 ^a	0.83 \pm 0.12 ^a	0.70 \pm 0.12 ^a	0.01 \pm 0.00 ^a	–	–
5.1	Dicafeoylquinic acid isomer I	515.12	–	–	–	3.23 \pm 0.05 ^a	0.08 \pm 0.00 ^b	0.01 \pm 0.00 ^c
5.17	Quercetin 3-O-ramnoside	447.09	0.57 \pm 0.04 ^a	0.43 \pm 0.13 ^a	0.18 \pm 0.04 ^b	–	–	–
6.14	Isomeric Dicafeoylquinic Acid II	515.12	–	–	–	0.03 \pm 0.00 ^a	0.01 \pm 0.00 ^a	–
8.73	Quercetin *	301.03	0.37 \pm 0.07 ^b	0.77 \pm 0.13 ^a	0.39 \pm 0.05 ^b	–	–	–
8.85	Kaempferol *	285.04	0.54 \pm 0.12 ^b	1.60 \pm 0.52 ^a	0.70 \pm 0.09 ^b	–	–	–

Data are mean values \pm SD, (n=9); treatments with different letters (a, b, c) indicate significant differences ($p < 0.05$) Statistical analyses performed by one-way Kruskal-Wallis test. *: Confirmed with commercial standards. -: not detected ($< 0.01 \mu\text{g mg}^{-1}$). Relative quantification was performed in comparison with naringenin (flavanones), kaempferol (flavonols), p-hydroxybenzoic acid (hydroxybenzoic acids), and caffeic acid (hydroxycinnamic acids).

WW: Effluent of shrimp grown in well water; DSW: Effluent of shrimp grown in diluted seawater; HS: Hydroponic DFT system to grow lettuce using a nutritive solution as control.

acid, p-Coumaric acid and ferulic acid were found in the soluble fraction of plants irrigated with WW and DSW effluents compared to the HS control. Most of these compounds showed the highest increases with the DSW treatment. Ribas-Agusti *et al.* (2011) found similar profiles to the ones in this study identifying eleven individual compounds, mainly esters of caffeic and coumaric acid, as well as quercetin glycosides. Isorhamnetin and quercetin glucosides increased by 5 and 3-fold in DSW treatments compared to the HS control; these flavonols have demonstrated important health benefit properties. Furthermore, it has been shown that isorhamnetin exerts anticancer effects by reducing tumor growth and COX-2 expression (Kim *et al.*, 2011). On the other hand, quercetin glucosides have shown positive health effects including activities such as anticancer, antitumor, cardiovascular protection, antiulcer, antiviral, anti-allergy, anti-inflammatory, antidiabetic, gastroprotective effects, antihypertensive, immunomodulatory, and antioxidant (Anand David *et al.*, 2016).

Phenolic acids, mainly caffeic, p-coumaric and ferulic identified in the soluble fraction, also evidenced an increase of about 40% in lettuces irrigated with DSW effluents compared to the control plants. These compounds are of great importance in human health given their protective antioxidant behavior and biological activities, such as the selective blockage of leukotrienes biosynthesis, which are involved in immunoregulation diseases, such as asthma and allergic reactions. Other studies have reported that caffeic acid and some of its esters might possess antitumor activity against colon carcinogenesis (Robbins, 2003). Regarding the insoluble fraction, significant increases were recorded in glucosides of caffeic acid. Similar to the soluble fraction, the highest increases were found in isorhamnetin and quercetin glucosides. Therefore, changes in phenolic profile of lettuce irrigated with DSW shrimp effluents could be of great importance in the nutraceutical quality of the products obtained.

Figure 2 shows the capacity of soluble and insoluble lettuce fractions to inhibit the formation of ABTS and DPPH radicals. Results indicated that the soluble fraction of plants irrigated with DSW shrimp effluents, increased the antioxidant capacity by 61% by the ABTS method as compared to control samples. However, the greatest effect for this radical inhibition was exerted by samples of WW treatment, which improved their antioxidant capacity up by ~3-fold in comparison to the HS control. It is known that the ABTS radical is scavenged with a wide range of compounds, mainly phenolic acids and flavonoids (Lin *et al.*, 2016). These results positively correlate with those obtained for total phenolic and flavonoid contents. Moreover, lettuce irrigated with WW effluents showed significantly higher amounts of p-coumaric and ferulic acids, as well as glucosides of isorhamnetin and quercetin (Table 3). On the other hand, the ABTS antioxidant capacity of insoluble fraction was about 5 times lower than for the soluble fraction, which could be attributed to the lower amount of phenolic acids and flavonoids found in these samples (Table 3).

With respect to the inhibition of the DPPH radical (Fig. 2B), we found increases of 42% in the antioxidant capacity of lettuce from WW treatments as compared to the HS control

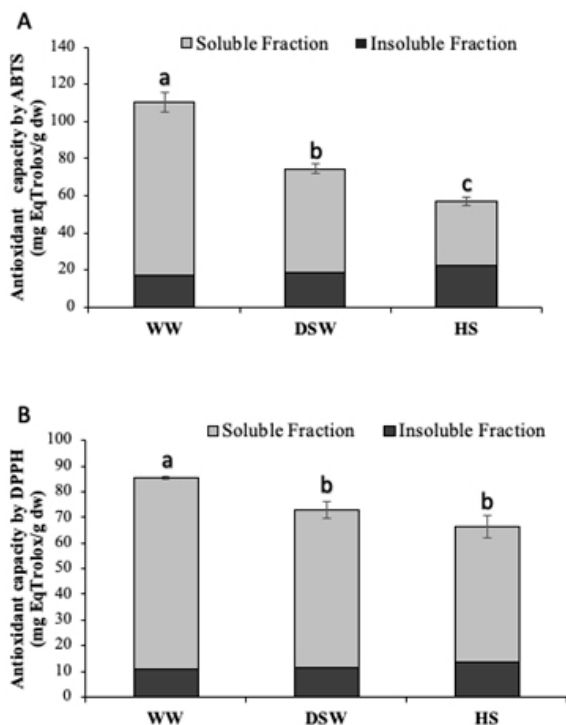


Figure 2. Antioxidant capacity ABTS (A) and DPPH (B) (mean \pm SD) of soluble and insoluble fractions of lettuce cultured with shrimp effluents from WW, DSW, and the HS control. Treatments with different letters (a, b, c) indicate significant differences ($p < 0.05$). Statistical analyses performed by a one-way Kruskal-Wallis test.

Figura 2. Capacidad antioxidante ABTS (A) y DPPH (B) (promedio \pm SD) de las fracciones soluble e insoluble de lechuga cultivada con efluentes camaronícolas WW, DSW y el control HS. Tratamientos con diferente letra (a, b, c) indica diferencias significativas ($p < 0.05$). Análisis estadístico efectuado con una prueba de Kruskal-Wallis.

in soluble fraction. It is known that the DPPH radical is highly inhibited by flavonoids, but not by phenolic acids or sugars (Mareček *et al.*, 2017), also, that DPPH is a electron transfer method and flavonoids are able to chelate free radicals immediately by donating hydrogen atom or by single-electron transfer (Banjarnahor and Artani, 2015). Ratty *et al.* (1988) tested flavonoid-DPPH interaction showing that quercetin was the most potent and it inhibited 42%, while the other flavonoids inhibited 14-23%, which agrees with the 4-fold increase found in quercetin 3-O-glucoside levels (Table 3) observed for the soluble fraction of the WW treatment. This compound has been identified as an excellent inhibitor of DPPH formation, as well as a potent alleviator of cytotoxicity on rat hepatocytes by improving the antioxidant activity of cells (Hu *et al.*, 2014). Regarding the insoluble fraction, DPPH inhibition was seven times lower than the observed for soluble fraction. This could be related to the small amount of phenolic acids and flavonoids identified in this fraction, indicating that the main antioxidant compounds in lettuce corresponds to soluble phenolics.

CONCLUSIONS

Shrimp effluent from low-salinity cultures has the potential to be used as an alternative source of water and nutrients for hydroponic lettuce var. *longifolia* cultivation, since it does not significantly affect the yield, physicochemical, or nutritional parameters of plants. The saline stress produced by the irrigation with WW effluents slightly decreased chlorophyll content in lettuce, and therefore its green color. Lettuce harvested from WW and DSW shrimp effluent treatments evidenced an improved quality in terms of phenolic compounds profile, mainly in plants irrigated with WW effluents, which highly increased its phenolic acid and flavanol contents, as well as its antioxidant capacity, by ABTS and DPPH methods. Thus, these plants could exert enhanced health benefits. These conclusions confirm the hypothesis that the lettuce *L. sativa* var. *longifolia* grown with low salinity shrimp effluents, exhibits an enhanced quality compared to that grown with a hydroponic solution.

ACKNOWLEDGEMENTS

Study supported by Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México and Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. We thank to H. Bojórquez-Leyva for the help in the lab.

REFERENCES

- Acosta-Motos, J.R., Ortuño, M.F., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez-Blanco, M.J. and Hernandez, J.A. 2017. Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms. *Agronomy* 7(1):1-38.
- Al-Maskri, A., Al Kharusi, L., Al-Miqbali, H. and Khan, M. 2010. Effects of salinity stress on growth of lettuce (*Lactuca sativa*) under closed-recycle nutrient film technique. *International Journal of Agriculture and Biology* 12(3):377-380.

- Anand David, A.V., Arulmoli, R. and Parasuraman, S. 2016. Overviews of biological importance of quercetin: a bioactive flavonoid. *Pharmacological Reviews* 10(20):84-89.
- AOAC. 1997. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- Arnao, M.B., Cano, A., Alcolea, J.F. and Acosta, M. 2001. Estimation of free radical-quenching activity of leaf pigment extracts. *Phytochemical Analysis* 12(2):138-143.
- Ayala-Astorga, G.I. and Alcaraz-Meléndez, L. 2010. Salinity effects on protein content, lipid peroxidation, pigments, and proline in *Paulownia imperialis* (Siebold & Zuccarini) and *Paulownia fortunei* (Seemann & Hemsley) grown in vitro. *Electronic Journal of Biotechnology* 13(5):13-14.
- Banjarnahor, S.D.S. and Artanti, N. 2015. Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia*. 23(4):239-244.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39(1):205-207.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 28(1):25-30.
- Chen, Z., Cuin, T.A., Zhou, M., Twomey, A., Naidu, B.P. and Shabala, S. 2007. Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58(15-16): 4245-4255.
- Chishaki, N. and Horiguchi, T. 1997. Responses of secondary metabolism in plants to nutrient deficiency. *Soil Science and Plant Nutrition* 43:987-991.
- Covarrubias-Cárdenas, A., Martínez-Castillo, J., Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., García-Cruz, N. and Pacheco, N. 2018. Antioxidant capacity and UPLC-PDA ESI-MS phenolic profile of stevia rebaudiana dry powder extracts obtained by ultrasound assisted extraction. *Agronomy* 8(9):170.
- DeRidder BP, Salvucci M. 2007. Modulation of Rubisco activase gene expression during heat stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) involves post-transcriptional mechanisms. *Plant Sci.* 172(2):246-252.
- Fierro-Sañudo, J.F., Rodríguez-Montes de Oca, G. and Páez-Osuna F. 2020. Co-culture of shrimp with commercial plants: a review. *Reviews in Aquaculture* 12:2411-2428.
- Garrido, Y., Tudela, J.A., Marin, A., Mestre, T., Martinez, V. and Gil, M.I. 2014. Physiological, phytochemical and structural changes of multi-leaf lettuce caused by salt stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(8):1592-1599.
- Hu, L., Yu, W., Li, Y., Prasad, K. and Tang, Z. 2014. Antioxidant activity of extract and its major constituents from okra seed on rat hepatocytes injured by carbon tetrachloride. *BioMed Research International* 341291.
- Kim, D.O., Chun, O.K., Kim, Y.J., Moon, H.Y. and Lee, C.Y. 2003. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(22):6509-6515.
- Kim, J.E., Lee, D.E., Lee, K.W., Son, J.E., Seo, S.K., Li, J., Jung, S.K., Heo, Y.S., Mottamal, M., Bode, A.M., Dong, Z. and Lee, H.J. 2011. Isorhamnetin suppresses skin cancer through direct inhibition of MEK1 and PI3-K. *Cancer Prevention Research* 4(4):582-591.
- León-Cañedo, J.A., Alarcón-Silvas, S.G., Fierro-Sañudo, J.F., Rodríguez-Montes de Oca, G.A., Partida-Ruvalcaba, L., Díaz-Valdés, T. and Páez-Osuna, F. 2019. Mercury and other trace metals in lettuce (*Lactuca sativa*) grown with two low-salinity shrimp effluents: accumulation and human health risk assessment. *Science of the Total Environment* 650:2535-2544.
- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., Kong, M., Li, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, H., Qin, W., Wu, H. and Chen, S. 2016. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules* 21(10):1374.
- Magdi, T.A., Mervat, S.S., URS, S. and Abdel-Kareem, M.E.S. 2013. Interactive effects of salinity stress and nicotinamide on physiological and biochemical parameters of faba bean plant. *Acta Biológica Colombiana* 18:499-510.
- Mareček, V., Mikyška, A., Hampel, D., Čejka, P., Neuwirthová, J., Malachová, A. and Cerkal, R. 2017. ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of Cereal Sciences* 73:40-45.
- Materska, M., Olszówka, K., Chilczuk, B., Stochmal, A., Pecio, T., Pacholczyk-Sienicka, B., Piacente, S., Pizza, C. and Masullo, M. 2019. Polyphenolic profiles in lettuce (*Lactuca sativa* L.) after CaCl₂ treatment and cold storage. *European Food Research and Technology* 245: 733-744.
- Mehraban, A., Kadali, F., and Miri, M. 2017. Influence of salt stress on lipids metabolism, photorespiration, photosynthesis and chlorophyll fluorescence in crop plants. *Chemistry Research Journal* 2(3):127-132.
- Mora-Rochin, S., Gutiérrez-Urbe, J.A., Serna-Saldivar, S.O., Sánchez-Peña, P., Reyes-Moreno, C. and Milán-Carrillo, J. 2010. Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. *Journal of Cereal Science* 52(3): 502-508.
- Nguyen P.M., Niemeyer E.D. Effects of nitrogen fertilization on the phenolic composition and antioxidant properties of basil (*Ocimum basilicum* L.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(18):8685-8691.
- Ouhibi C, Attia H, Rebah F, Msilini N, Chebbi M, Aarouf J, Urban L, Lachal M. 2014. Salt stress mitigation by seed priming with UV-C in lettuce plants: growth, antioxidant activity and phenolic compounds. *Plant Physiol Biochem*. 83:126-33.
- Páez-Osuna, F. 2001. The environmental impact of shrimp aquaculture: causes, effects, and mitigating alternatives. *Environmental Management* 28(1):131-140.
- Ramos-Sotelo, H., Valdez-Ortiz, Á., Germán-Báez, L.J., Fierro-Sañudo, J.F., León-Cañedo, J.A., Alarcón-Silvas, S.G., Reyes-Moreno, C. and Páez-Osuna, F. 2019. Quality of lettuce *Lactuca sativa* (var. Tropicana M1) grown with two low-salinity shrimp effluents. *Food Chemistry: X* 2:100027.
- Ratty, A. K., Sunamoto, J. j. and Das, N.P. 1998. Interaction of flavonoids with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical, liposomal membranes and soybean lipoxygenase-1. *Biochemical pharmacology* 37(6):989-995.
- Ribas-Agusti, A., Gratacos-Cubarsi, M., Sarraga, C., Garcia-Regueiro, J.A. and Castellari, M. 2011. Analysis of eleven phenolic compounds including novel p-coumaroyl derivatives in lettuce (*Lactuca sativa* L.) by ultra-high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. *Phytochemical Analysis* 22(6):555-563.

Robbins, R.J. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(10):2866-2887.

Sharma, V. and Ramawat, K.G. 2013. Salinity-induced modulation of growth and antioxidant activity in the callus cultures of miswak (*Salvadora persica*). *3 Biotech* 3(1): 11-17.

Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M. and Zheng, B. 2019. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules* 24(13):2452.

Shetty, K. 2004. Role of proline-linked pentose phosphate pathway in biosynthesis of plant phenolics for functional food and environmental applications: a review. *Process Biochemistry* 39(7):789-804.



Isolation and properties of collagen extracted from mixed by-products obtained from different fish species

Aislamiento y propiedades de colágeno extraído de una mezcla de subproductos de diferentes especies de pescado

Celia Olivia García-Sifuentes*, Julio Cesar Zamorano-Apodaca, Marcel Martínez-Porchas, Susana Maria Scheuren-Acededo, and Miguel Angel Mazorra-Manzano.

Laboratorio de Bioquímica y Calidad de Productos Pesqueros. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), Carretera Gustavo Astiazarán Rosas No. 46. Hermosillo, Sonora, México, Cp 83304. Ph/Fax: +52(662)280-0421, +52(662)289-2400 ext 606

ABSTRACT

Fish by-products consisting of skin, bones, or scales are collagen sources. Acid-soluble collagen (ASC) and pepsin-soluble collagen (PSC) mixed by-products derived from different fish species were extracted and evaluated. The properties evaluated for both collagens were chemical composition, amino acid- and SDS-PAGE- protein profiles, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), denaturation temperature (T_{max}), enthalpy (ΔH), and solubility. The ASC and PSC registered a protein content of 48.56 and 38.80 %, respectively. From the total amino acids detected, hydroxyproline accounted for 7 % and 6 % for ASC and PSC, respectively. The electrophoretic profile showed the presence of the type I collagen bands ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β , and γ), whereas FTIR spectrum showed the presence of diverse collagen functional groups (Amide A, B, I, II, and III) for both extracted types, and demonstrated that the extraction process did not affect the collagen's triple-helical structure. The T_{max} of ASC and PSC were 38.27 and 38.07° C, respectively, whereas ΔH were 0.64 and 0.33 J g⁻¹. The lowest solubility was registered at pH 5 for ASC and pH 9 for PSC. The characteristics of the collagen extracted, indicated that a mixture of by-products from different species could be an alternative for their reutilization by the local markets.

Keywords: fish by-products, collagen, isolation, properties, physico-chemical, industrial application.

RESUMEN

Los subproductos de pescado como pieles, huesos o escamas son fuentes de colágeno. Se extrajo y evaluó el colágeno soluble en ácido (ASC) y soluble en pepsina (PSC) derivados de diferentes especies. Las propiedades evaluadas para ambos colágenos fueron composición química, amino ácidos, perfil electroforético, FTIR, temperatura y entalpía de desnaturalización y, solubilidad. El ASC y PSC registraron 48.6 y 38.8 % de proteína, respectivamente. El ASC y PSC presentaron 7 % y 6 % de hidroxiprolina. El perfil electroforético mostró la presencia de bandas de colágeno tipo I ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β , and γ), el espectro de FTIR mostró los grupos funcionales del colágeno (Amide A, B, I, II, and III) y demostró que el proceso de extracción no afectó la estructura de triple hélice. La T_{max} de ASC y PSC fueron 38.27 y 38.07° C, respectivamente, mientras

que el ΔH fue 0.64 and 0.33 J g⁻¹. La solubilidad más baja fue a pH 5 para ASC y a pH 9 para PSC. Ambos tipos de colágeno se extrajeron exitosamente y, basados en sus características estructurales, pueden ser una alternativa para la industria de alimentos, biomédica y farmacológica.

Palabras clave: subproductos de pescado, colágeno, aislamiento, propiedades.

INTRODUCTION

Filleting of fish species generates a considerable amount of waste; for example, more than 70 % of solid by-products are discarded, including skeletons, bones, viscera, heads, tails and skins. Together, these constitute an excellent source of high-quality protein. Particularly skin, bones, and scales, can be used to produce collagen and gelatin (Karayanakidis and Zotos, 2016; Välimaa *et al.*, 2019). Approximately 29 different types of collagen have been identified, each with a different amino acid sequence and biophysical properties. The type I collagen is the most common, made up of three polypeptide chains twisted into a triple-helix. Two of the polypeptides are designed as $\alpha 1$ when the chain $\alpha 1$ bonded to another chain $\alpha 1$, form a third chain ($\alpha 2$), which are linked by a hydrogen bond (Yang *et al.*, 2016; Leilei *et al.*, 2017a; Tan and Chang, 2018). The molecular weight of collagen is 300 kDa and approximately 100 kDa for each chain. Most of the collagen obtained from fish by-products is type I and II, having a strong relationship among the molecular weight and the thermal stability. Usually, greater thermal stability occurs at a higher molecular weight. Therefore, the collagen extraction yield and its properties are affected by the extraction method, raw material, pre-treatment, and enzymes used (Pal and Suresh, 2016).

Currently, collagen is extracted from skins and bones of porcine and bovine. However, epidemic events affecting livestock encouraged researchers to endeavor in finding a new collagen source from fish, or fish waste materials, by isolating acid-soluble collagen (ASC), pepsin soluble collagen (PSC), salt soluble collagen (SSC), and ultrasonic collagen (UAC) (Pal *et al.*, 2015; Hamdan and Sarbon, 2019). Several studies have addressed the characterization and extraction of collagen from different fish by-products, such as *Thunnus albacares*, *Carcharhinus albimarginatus*, *Ctenopharyngodon*

*Autor para correspondencia: Celia Olivia García Sifuentes
 Correo electrónico: sifuentes@ciad.mx

Recibido: 7 de abril de 2021

Aceptado: 21 de julio de 2021

Idella, *Ictalurus punctatus*, *Oreochromis niloticus*, *Gadus macrocephalus*, *Rana nigromaculata* and *Ctenopharyngodon idella* (Onouma *et al.*, 2014; Elango *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015a; Yuqing *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Leilei *et al.*, 2017b; Leilei *et al.*, 2017a; Zhang and Duan, 2017; Zhu *et al.*, 2019); however, these focused on specific fish species. Still, there are scarce studies considering a mix of by-products generated after the filleting of different fish species, as happens frequently in different markets. For instance, more than 3000 tons of by-products produced per year in México can be used to obtain collagen instead of discarding as leftovers (García-Sifuentes *et al.*, 2020). In this sense, finding an alternative for using these mixtures of fish by-products is imperative, generating a potential added value while indirectly contributing to the reduction of waste generation at the local markets or distribution centers, and thus avoiding environmental impacts. Therefore, the objective of this study was to isolate and evaluate ASC and PSC from a mixture of by-products derived from different fish species.

MATERIALS AND METHODS

Materials

As described in a previous study (Zamorano-Apodaca *et al.*, 2020), leftovers of mixed by-products (skins, heads, and skeletons) from various fish species (different sharks, mullet, guitarfish, weakfish, snapper, ray, squid, seabass, and pompano dolphinfish), discarded by the largest distribution market in Mexico, were used for the study. Three different samples were analyzed. All chemicals used in the present work were of analytical grade.

Sample preparation

Once in the laboratory, the mixture of by-products were homogenized at 4° C, 5 minutes, and maximum velocity by using a cutter. The three samples obtained were stored at -20° C for less than a week for further analysis, and some sample was also lyophilized.

The pre-treatment of the sample obtained from the mix of different fish species by-products, and the subsequent extraction of acid (ASC) and pepsin soluble collagen (PSC), were conducted using the method described previously (Zamorano-Apodaca *et al.*, 2020).

Obtention of acid (ASC) and pepsin (PSC) soluble collagen

The ASC and PSC extractions were performed at 25° C. The ASC was extracted with a 0.5 M acetic acid solution for 24 h, as described by Zamorano-Apodaca *et al.* (2020). The PSC extraction was carried out with 0.01 % pepsin solution w/v (dissolved in 0.5M of acetic acid) for 24 h and centrifuged at 10,000 ×g for 20 minutes, considering the supernatant obtained as the PSC.

The ASC and PSC solutions were ultrafiltrated as described by Zamorano-Apodaca *et al.* (2020). The concentrated collagen was finally freeze-dried.

Yield and proximate composition

The yield was obtained based on the raw material wet weight, whereas, the proximate composition of the by-product homogenates, ASC and PSC, were estimated by quantifying protein, lipids, moisture, and ash, according to the AOAC (2000) methods (960.52, 920.39, 950.46, 920.153, respectively). To calculate the crude protein content the 6.25 general Jones conversion factor was used.

Amino acid quantification

The quantification of amino acids was carried out by HPLC (Vázquez *et al.*, 1997), with modifications described by Zamorano-Apodaca *et al.* (2020). Six to eight milligrams of both lyophilized collagen types were used for the analysis. The identification of amino acids was carried out by considering the retention time, compared with a standard mixture of amino acids and the results were reported as mg/g of sample.

Electrophoretic pattern

The electrophoretic separation of ASC and PSC was performed according to the method of Laemmli (1970) using 7 % separation gel and 4 % stacking gel. A 1 g sample of collagen was dissolved in a 5 % SDS and 0.1 % β-mercaptoethanol solution. Samples were homogenized and heated at 80° C for 1 h. The cold sample was centrifuged at 3,000 ×g for 15 minutes at 25° C (Avanti J-26S XPI, Beckman Instruments INC. Palo Alto CA), and 40 μg of protein were loaded per path once the protein was quantified (Gornall *et al.*, 1948). To calculate the proteins molecular weight, the bands were stained with coomassie brilliant blue, and a wide-range standard (6.5-200 kDa) was used to analyze these bands.

Structural properties

PSC and ASC functional groups were determined by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), following the method described by Yousefi *et al.* (2017). The infrared spectra used ranged from 4000 to 400 cm⁻¹ using a Bruker model IFS 66/S infrared spectrophotometer (Bruker Optics Limited, Coventry, UK), equipped with attenuated total reflectance ATR (SPECAC, Orpington, UK). Freeze-dried ASC and PSC were placed into the ATR and the resulting spectra were analyzed using the OriginPro 8 software (OriginLab Corporation, Northampton, United States).

Temperature and enthalpy of thermal denaturation

The temperature and enthalpy of thermal denaturation were monitored by following the methodology proposed by Rashidy *et al.* (2015), and using a DSC7 calorimeter (Perkin Elmer de México, S.A. Monterrey, México). Three mg of ASC and PSC were re-hydrated with 27 μL of 0.5 M acetic acid, and the sample was scanned at 5 °C per minute from 10 to 90° C under high atmospheric nitrogen conditions (40 mL N₂/minute). The initial and maximum transition temperatures (T_{ons}, T_{max}) and the enthalpy (ΔH) were calculated from the thermogram using the Pirys software (Perkin Elmer de México, S.A.).

Solubility

The ASC and PSC solubility was determined following the method described by Matmaroh *et al.* (2011). Briefly, the ASC and PSC samples were dissolved in 0.5 M acetic acid to a concentration of 3 mg/mL, and the mixtures were stirred at 4° C for 3h. Then, the collagen solution (3 mg/mL, aliquots of 8 mL) was adjusted to pH 3, 5, 7, 9 with 6 N NaOH or 6 N HCl as required. The volume of the solution was adjusted to 10 mL, stirred at 4°C for one h and centrifuged. Finally, the protein content in the supernatant was determined (Lowry *et al.*, 1951). The relative solubility was calculated by comparing this parameter with that obtained at the pH giving the highest solubility.

Statistical analyses

Three different samples were taken (random sampling), the experimental design was a one way analysis of variance (ANOVA) performed by using the NCSS software (NCSS, 2011) and a level of significance of 5 %. All the experiments were conducted in triplicates (n=3) for the three samples.

RESULTS AND DISCUSSION

Yield

Pepsin soluble collagen (PSC) and acid soluble collagen (ASC) were successfully isolated from a mix of by-products obtained from different fish species. The wet-weight basis yield of ASC (4.4 %) was 2-fold higher than PSC (2.2 %), in concordance to Hamdan and Sarbon (2019) and Veeruraj *et al.* (2015), who reported higher yields for ASC compared to PSC. Both studies explained that the low concentration of acetic acid used (0.5 M) had a significant efficiency, ensuring a complete extraction while maintaining the collagen structure. Likewise, ASC and PSC were isolated from sailfish skin with yields of 5.76 and 2.11 % (wet weight basis), respectively (Tamilmozhi *et al.*, 2013); however, the authors reported the incomplete solubilization of the skin. The type of sample probably influenced the yield obtained in our study since high amounts of non-collagenous proteins may be contained in a mix of by-products from different species. On the other hand, the market where the sample was obtained does not regulate the ratio of each by-product; however, the composition of the mixed by-products is similar throughout the year as reported by García-Sifuentes *et al.* (2020), therefore, it is assumed that the yield of the collagen is not significantly affected by the sampling period.

Additionally, the extraction time of the collagen was 24 h instead of 48, or even 72 h, as reported by other authors (Liu *et al.*, 2015a; Zhu *et al.*, 2019).

Regarding the extraction temperature, Liu *et al.* (2015a) showed that a complete extraction of ASC was maintained regardless of the extraction temperature (4, 10, 15, 20° C) at 0.5 M of acetic acid concentration, indicating that the extraction temperature did not affect the extraction yield in our experiment. Liu *et al.* (2015) did not find structural modifications of ASC at 20° C, which is a temperature that could be convenient for practical and industrial applications. Similar

results will be shown later in the present study.

Papain was used to remove non-collagenous protein (NCP) and the exposition time was 1h, at pH 7.8-8.0, and 23° C. Under these conditions and using an electrophoresis approach, Hong *et al.* (2019) reported that papain fails to disrupt the collagen structure after one hour of incubation. Still, after 24 hours the collagen structure was disrupted. In this study, the presence of collagen in NCP (data not shown) was not observed through electrophoresis nor amino acid quantification. The effectiveness of the papain enzyme is associated with its activity in the linear structure of the protein, whereas the collagen peptide bonds are not fully accessible to the proteases since the molecule has secondary and tertiary structures, in addition to enzymatic and non-enzymatic cross-linking between fibrils; therefore, hydrolysis would depend directly on the experimental conditions (pH, temperature, time, ion strength, etcetera). Thus, papain is not as effective for hydrolyzing collagen cross-link bonds under these conditions. Collagen hydrolysis with papain can be performed, but temperatures above 65° C and pH from 5 to 7 are required.

Proximate composition

The proximate composition of the mixed by-products from different fish species, ASC, and PSC are shown in Table 1. The raw homogenate of mixed by-products from various fish species was high in moisture content, coinciding with the value reported by Kosseva *et al.* (2013). The second essential component showing high levels was protein, enhancing the relevance of collagen extraction. The lipid content turned out to be a minor component, which is explained based on the lean species sampled and therefore, the collagen yield was not affected by this component. The protein content of ASC was 10 % higher than PSC, while ash and moisture were similar for both collagen types, and no lipids were detected, probably because the raw homogenate had a meager quantity (1.76 %) that could be removed during the first wash, after the deproteinization process. Protein content reported by Solari and Cordova (2015) was less than 74 %, which can be attributed to the modifications in the extraction process (Zamorano-Apodaca *et al.*, 2020). However, collagen recov-

Table 1. The proximate composition (%) of the mix of by-products homogenate from different fish species, acid soluble collagen (ASC) and pepsin soluble collagen (PSC).

Tabla 1. Composición proximal (%) de la mezcla de subproductos de diferentes especies, colágeno soluble en ácido (ASC) y colágeno soluble en pepsina (PSC).

Sample	Protein	Ash	Moisture	Fat
H (%)	17.41 ± 0.07	5.38 ± 0.07	72.50 ± 0.21	1.76 ± 0.08
ASC (%)	48.56 ± 3.77 ^a	27.69 ± 4.01 ^a	5.59 ± 0.10 ^a	nd
PSC (%)	38.80 ± 6.31 ^b	27.98 ± 0.01 ^a	5.49 ± 0.17 ^a	nd

Different superscript letters between ASC and PSC show significant difference ($P < 0.05$). H: mix of by-products homogenate. nd: not detected.

ery was not structurally affected by the extraction process, as shown by FTIR and DSC analyses. Though the lyophilized ASC and PSC extract were not utterly pure because both contained high ash levels, the results showed hydroxyproline contents of 7 and 6 %, respectively and therefore, the conversion factor to collagen was 14.28 and 16.66. Finally, when the total nitrogen content of the ASC and PSC was multiplied by the factor, it revealed that the protein recovered in lyophilized ASC and PSC was 100 % collagen.

Amino acid quantification

The ASC and PSC amino acid composition is shown in Table 2. Differences ($P < 0.05$) among them were observed for all amino acids quantified, except glutamic acid, histidine, serine, histidine, threonine, methionine, and lysine. Then, the major amino acid quantities were detected in the following descending order: glycine, proline, glutamic acid, arginine, alanine, and hydroxyproline for ASC, whereas for PSC were glycine, glutamic acid, arginine, proline, threonine, alanine, aspartic acid, and hydroxyproline. Glycine, proline, and hydroxyproline are the essential amino acids of collagen and its contents showing proportions of 27 %, 15 %, and 7 %, respectively for ASC, and 26 %, 9 %, and 6 %, respectively for PSC. Hydroxyproline is the most critical amino acid because it is exclusively associated with stromal proteins such as collagen. Glycine was the most abundant amino acid detected, and its quantity is explained because of its detection in every third amino acid residue of the collagen structure. The results

Table 2. Amino acid composition of acid soluble collagen (ASC) and pepsin soluble collagen (PSC).

Tabla 2. Composición de aminoácidos de colágeno soluble en ácido (ASC) y colágeno soluble en pepsina (PSC).

Amino acid	PSC (mg/g)	ASC (mg/g)
Aspartic acid	38.7 ± 5.5 ^a	31.6 ± 3.1 ^b
Glutamic acid	61.4 ± 6.8 ^a	59.1 ± 4.5 ^a
Serine	15.1 ± 1.7 ^a	16.3 ± 1.8 ^a
Histidine	1.9 ± 1.1 ^a	1.3 ± 0.4 ^a
Arginine	51.8 ± 7.0 ^a	57.7 ± 6.0 ^b
Glycine	143.4 ± 20.9 ^a	170.4 ± 22.1 ^b
Threonine	40.3 ± 12.4 ^a	31.6 ± 6.3 ^a
Alanine	41.1 ± 4.9 ^a	50.3 ± 7.4 ^b
Tyrosine	8.9 ± 1.8 ^a	5.4 ± 1.8 ^b
Methionine	5.2 ± 1.0 ^a	5.3 ± 0.8 ^a
Valine	14.0 ± 2.1 ^a	10.5 ± 2.0 ^b
Phenylalanine	8.4 ± 2.9 ^a	4.6 ± 1.7 ^b
Isoleucine	9.7 ± 1.2 ^a	7.4 ± 1.6 ^b
Leucine	17.8 ± 1.5 ^a	15.6 ± 1.8 ^b
Lysine	23.2 ± 4.1 ^a	24.6 ± 2.9 ^a
Proline	48.4 ± 14.8 ^a	94.1 ± 16.4 ^b
Hydroxyproline	31.5 ± 7.1 ^a	43.9 ± 16.1 ^b

All values are mean ± SD, n=3. Different superscript letters between same row show significant difference ($P < 0.05$).

obtained from this study were similar to those reported for pigskin and marine fish scales from Japan and Vietnam (*Saurida* spp., *Trachurus japonicus*, *Mugil cephalis*, *Cypselurus melanurus*, *Dentex tumifrons*), registering proline proportions of 13.1 % and 10.1 % respectively, 9.8 % and 6.4 % of hydroxyproline, and 32.2 % and 33.8 % of glycine (Thuy *et al.*, 2014; Duconseille *et al.*, 2015).

Electrophoretic pattern

Although, the protein patterns for ASC was reported in a previous study (Zamorano-Apodaca *et al.*, 2020), the comparison among both ASC and the PSC are shown in Figure 1. A similar pattern was observed for both collagen types, with higher molecular weights for $\alpha 1$ bands (129-139 kDa) than $\alpha 2$ bands (119-126 kDa). The β and γ bands for both collagen types were >200 kDa. These bands are characteristic properties of collagen because of their α triple helix chains with molecular weights around 100 kDa. The $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains can be linked together, forming the β chain, however, when three α chains ($\alpha 1$, $\alpha 2$) are linked together by intermolecular or intramolecular bonds, these form a new arrangement

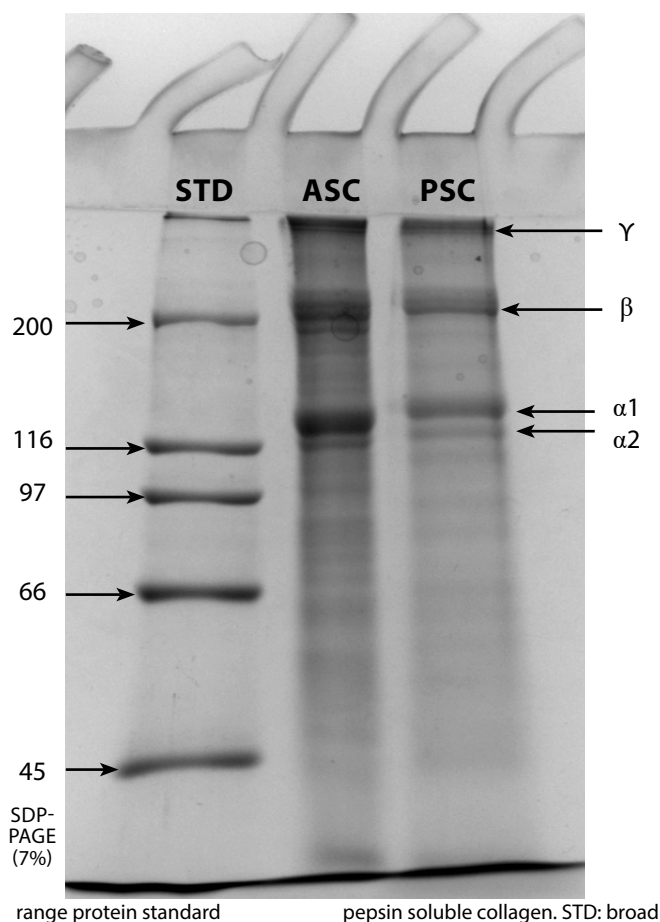


Figure 1. SDS-PAGE (7%) electrophoretic pattern of acid soluble collagen (ASC) and pepsin soluble collagen (PSC). STD: broad range protein standard.

Figura 1. Patrón electroforético por SDS-PAGE (7%) de colágeno soluble en ácido (ASC) y colágeno soluble en pepsina (PSC). STD: Estándar de amplio margen.

which is considered as the γ chain (Sun *et al.*, 2017; Yousefi *et al.*, 2017; Slimane and Sadok, 2018). The β and γ -chains observed in both ASC and PSC, indicate the presence of high MW cross-links, but the band intensity of β -chain and α -chain of ASC was more intense than that observed in PSC. This suggests that the acid was able to cleave the telopeptide region, thereby releasing more α - and β -chains in ASC. Contrary to our results, Ali *et al.* (2017) reported β -chain and α -chain more intense in PSC.

The most abundant and essential collagen is Type I, because it is a natural macromolecular hydrocolloid used by the food, pharmaceuticals, cosmetic, and biomedical industry. This kind of collagen could be obtained from bones, skin, ligaments, tendons, cornea, and scales of fisheries by-products (Jie *et al.*, 2018), as used in the present study.

Structural properties

Infrared spectroscopy with Fourier transform, attenuated total reflectance (FTIR-ATR)

As the peak of interest is produced at a specific wavelength and absorbance, the functional group (amide A, amide II, amide III) and its vibration mode could be identified.

Figure 2 shows the infrared spectrum of the ASC and PSC obtained from the tested by-products mixture. The spectrum show the presence of the specific functional groups of collagens (Amide A, B, I, II, and III).

The amide A functional group was located at 3293 and 3288 cm^{-1} for ASC and PSC, respectively, indicating the presence of amino groups (N-H) involved in the association of hydrogen bonds, and having a strong hydrogen bond into the ASC and PSC. The amide B functional group is associated with the asymmetric stretching vibrations of the $=\text{C}-\text{H}$ and $-\text{NH}^{+3}$ bonds. The ASC and PSC amide functional groups B were detected at 2932 cm^{-1} and 2933 cm^{-1} , respec-

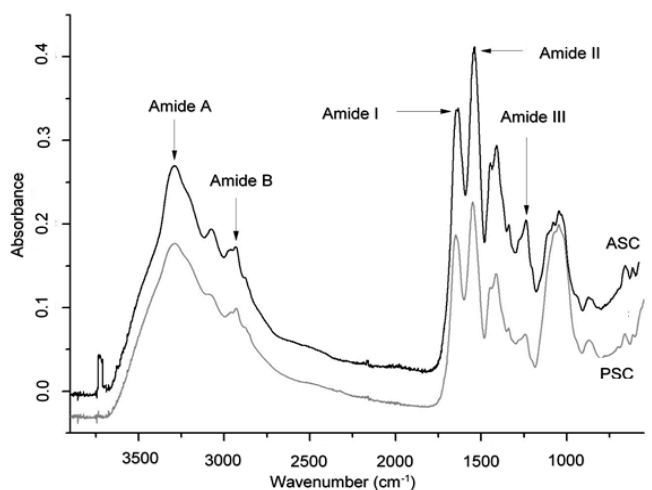


Figure 2. FTIR spectrum molecular identification of acid soluble collagen (ASC) and pepsin soluble collagen (PSC) from mixed by-products of different species.

Figura 2. Espectro de identificación molecular por FTIR de colágeno soluble en ácido (ASC) y colágeno soluble en pepsina (PSC).

tively. The amide I functional group is associated with the stretching vibrations of the carbonyl groups ($\text{C}=\text{O}$), either in the polypeptide or in the hydrogen bond coupled with a carboxyl group (COO^-) (Yousefi *et al.*, 2017; Ahmed *et al.*, 2018). In the ASC and PSC, this functional group was located at 1639 and 1648 cm^{-1} , indicating a good degree of molecular order, supporting the claim that “the lower the wave number of the functional group, the greater the molecular order of the collagen”. This observation confirmed that the formation of a hydrogen bond between N-H stretch (X position) and $\text{C}=\text{O}$ (Gly) of the fourth residue is responsible for the formation of a triple helix.

The amide II functional group is associated with the flexion of the NH groups coupled with the stretching vibrations of the CN and NH groups. In the ASC and PSC samples, the functional group was located at 1541 cm^{-1} and 1550 cm^{-1} ; this indicates that the most of the hydrogen bonds are given by the amino groups (Barth and Zscherp, 2002; Yousefi *et al.*, 2017), and ASC presented more and/or stronger hydrogen bonds than PSC because the amide II peaks were detected at a lower wavelength. This suggests that acid disrupted the non-helical portion of telopeptide regions, resulting in a higher structure order of ASC.

The amide III functional group is associated with the flexion of the N-H group from the amide bonds and complex with intermolecular interactions in collagen as C-N stretching, N-H in plane bending from amide linkages as well as vibrations from CH_2 of glycine backbone and proline side-chains (Zhang *et al.*, 2014; Zhang and Duan, 2017). In the ASC and PSC samples, the amide III functional group was located at 1239 and 1240 cm^{-1} , indicating that hydrogen bonds were involved in ASC and PSC.

Additionally, the absorption peaks corresponding to pyrrolidine ring vibration of hydroxyproline and proline for ASC and PSC, were observed at 1450 y 1449 cm^{-1} , respectively. The ratio between amide III and pyrrolidine ring vibration of proline and hydroxyproline of ASC and PSC were 1.17 (~1) (Plepis *et al.*, 1996; Ahmed *et al.*, 2018), revealing that the ASC and PSC were not denatured during the extraction, and the triple-helical structure was still preserved. The triple helix structure is responsible for the rigidity and strength of the collagen fibers (Matmaroh *et al.*, 2011; Veeruraj *et al.*, 2013). Based on the position of amide A, I and, II bands of ASC that were shifted to lower wavenumber as compared to PSC, it could be inferred that ASC would result in a higher structure order of collagen.

Temperature and enthalpy of thermal denaturation

No significant differences were detected for the ASC and PSC initial thermal transition (T_{ons}) and maximum temperature of thermal denaturation (T_{max}), whereas for enthalpy (ΔH), differences were observed ($P < 0.05$). T_{ons} for ASC and PSC were $35.09 \pm 0.88^\circ \text{C}$ and $35.46 \pm 2.1^\circ \text{C}$, respectively, T_{max} of $38.27 \pm 0.87^\circ \text{C}$ and $38.07 \pm 2.09^\circ \text{C}$, and ΔH $0.64 \pm 0.21 \text{ J g}^{-1}$ and $0.33 \pm 0.19 \text{ J g}^{-1}$, respectively. Noteworthy, PSC had lower ΔH values compared to ASC, which might be due to

the permanence of the telopeptide region after treatment, resulting in a less compact PSC structure. Consequently, PSC requires less energy for destabilization than ASC. Benjakul *et al.* (2010) reported that the collagen thermal stability is associated with the pyrrolidine rings and hydrogen bonds of the hydroxyproline hydroxyl group, and in this sense, the amino acids content (20 and 14 % for ASC and PSC, respectively) also influenced the collagen stability.

T_{max} values were similar to the reported by Ali *et al.* (2017), for golden carp (*Probarbus jullieni*) scales, of ASC (37.67° C) and PSC (37.83° C), and higher than the reported for catfish, ASC (36.12° C) and PSC (35.57° C) by Tan and Chang (2018). Coinciding with our results, these authors also showed less ΔH for PSC.

Effect of pH on Solubility

ASC and PSC relative solubility results are shown in Figure 3. Overall, the PSC showed a higher solubility ($P < 0.05$) than ASC. The PSC relative solubility ranged from 62.8 to 100 %, while ASC from 62.2 to 99 %. As expected, both PSC and ASC showed the highest solubility at pH 3, whereas the lowest solubility was detected at pH 9. However, although a sharp decrease in solubility can be seen at pH 5 for PSC, probably due to the pepsin effect, its lowest solubility was at pH 9. Our results were similar to those reported for ASC and PSC obtained from spotted golden goatfish scales (Matmaroh *et al.*, 2011), carp (*Catla*) scales (Pal and Suresh, 2017), and channel catfish skin (Tan and Chang, 2018). These authors observed the highest solubility under acidic conditions (pH 2-5), with a sharp decrease at pH 5. However, the solubility increases at alkaline pH (11) as reported for the spotted golden goatfish scales PSC (Matmaroh *et al.*, 2011). The ASC and PSC highest solubility at acidic pH could be associated with the discrepancy between pH and the isoelectric point. The protein net charge was different to zero, then, the repulsion forces between the collagen chain molecules increased, resulting in better solubilization. In contrast, when the pH is

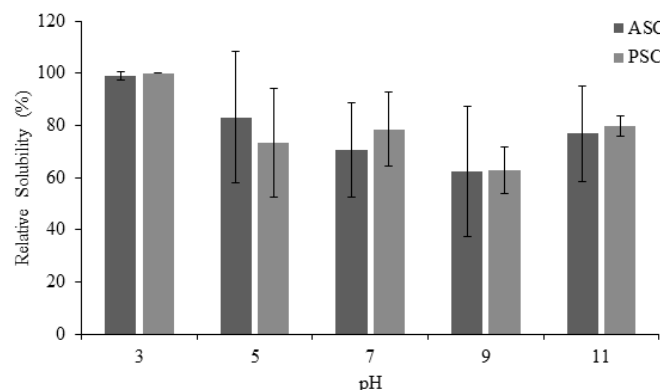


Figure 3. Relative solubility (%) of acid soluble collagen (ASC) and pepsin soluble collagen (PSP) from mixed by-products of different species at different pH. All the values are mean \pm standard deviation ($n=3$).

Figura 3. Solubilidad relativa (%) de colágeno soluble en ácido (ASC) y colágeno soluble en pepsina (PSC) derivados de una mezcla de subproductos de diferentes especies de pescado a diferentes pH. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar ($n=3$).

equal or close to the isoelectric point, the total net charge of the protein molecules approaches to zero, and the protein precipitation and aggregation occurs.

The results of our study revealed that the mixed by-products from different fish species represent a rich source of collagen with desirable physicochemical characteristics. At the same time, the extraction process is technically feasible, considering that no abrupt denaturation of the collagen structure happened.

CONCLUSION

Acid soluble collagen (ASC) and pepsin soluble collagen (PSC) obtained from mixed by-products from different fish species were successfully extracted. The yield, protein, and hydroxyproline contents of ASC were higher than PSC. However, both were identified as type I collagen, and the particular functional groups of collagens were observed. No denaturation of collagen was detected, demonstrating that the extraction process did not affect the collagen's structure. The PSC solubility was better than ASC, and the ΔH was lower. Therefore, PSC is probably more functional than ASC probably due to a less compact structure. One of the novel aspects of this work is the fact of employing a mixture of different species by-products, and in this sense, all these results could be used as a basis for crafting strategies to assist the reutilization of waste and by-products from the local markets or big distribution centers. Therefore, both extracted collagens could be an alternative for the food, pharmacological, and biomedical industries.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank FONSEC-SEP-CONACyT for the project support.

REFERENCES

- Ahmed, R., Tilahun, A.G., Cho, J., Chun, B. 2018. Application of bacterial collagenolytic proteases for the extraction of type I collagen from the skin of bigeye tuna (*Thunnus obesus*). *LWT- Food Science and Technology*. 89: 44-51.
- Ali, M.A.M., Benjakul, S., Kishimura, H. 2017. Molecular characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the scales of golden carp (*Probarbus jullieni*). *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 29(6): 450-457.
- Barth, A., Zscherp, C. 2002. What vibrations tell about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 35(4): 369-430.
- Benjakul, S., Thiansilakul, Y., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Kishimura, H., Prodpran T., Meesane, J. 2010. Extraction and characterization of pepsin-solubilized collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90(1): 132-138.
- Chi, C.F., Cao, Z.H., Wang, B., Hu, F.Y., Li, Z.R., Zhang, R. 2014. Antioxidant and Functional Properties of Collagen Hydrolysates from Spanish Mackerel Skin as Influenced by Average Molecular Weight. *Molecules*. 19(8): 11211-11230.
- Duconseille, A., Astruc, T., Quintana, N., Meersman, F. 2015. Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. *Food Hydrocolloids*. 43: 360-372.

- Elango, J., Wua, W., Wang, N., He, L., Bin, B. 2014. Isolation, purification and characterization of pepsin soluble collagen isolated from silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) skeletal and head bone. *Process Biochemistry* 49: 1764-1777.
- García-Sifuentes, C.O., Scheuren-Acevedo, S.M., Zamorano-Apodaca, J.C. 2020. Exploring different by-products considered as residues by the fishery industry in México. *Biotecnia*. XXII(2): 61-69.
- Hamdan, F.S., Sarbon, N.M. 2019. Isolation and characterization of collagen from fringescale sardinella (*Sardinella fimbriata*) waste materials. *International Food Research Journal*. 26(1): 133-140.
- Hong, H., Fan, H., Chalamaiah, M., Wu, J. 2019. Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): Current progress, challenges, and future perspectives. *Food chemistry*. 30(15): 125222.
- Jie, L., Wang, M., Qiao, Y., Tian, Y., Liu, J., Qin, S., Wu, W. 2018. Extraction and characterization of type I collagen from skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its potential application in biomedical scaffold material for tissue engineering. *Process Biochemistry*. 74: 153-163.
- Karayannakidis, D.P., Zotos, A. 2016. Fish Processing By-Products as a Potential Source of Gelatin: A Review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 25(1): 65-92.
- Kosseva, M.R. 2013. Sources, Characterization, and Composition of Food Industry Wastes. In: *Food Industry Wastes*. R.M Kosseva y C. Webb (Ed.), pp 37-60. Elsevier Inc. USA.
- Leilei, S., Bafang, L., Wenkui, S., Leilei, S., Hu, H. 2017b. Characterization of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin collagen and fabrication of collagen sponge as a good biocompatible biomedical material. *Process Biochemistry*. 63: 229-235.
- Leilei, S., Hu, H., Bafang, L., Zhang, Y. 2017a. Characterization of acid- and pepsin-soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Biological Macromolecules*. 99: 8-14.
- Liu, D., Wei, G., Li, T., Hu, J., Lu, N., Regenstein, J.M., Zhou, P. 2015a. Effects of alkaline pre-treatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*. 172: 836-843.
- Liu, D., Zhang, X., Li, T., Yang, H., Zhang, H., Regenstein, J.M., Zhou, P. 2015a. Extraction and characterization of acid-and pepsin-soluble collagens from the scales, skins and swim-bladders of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Bioscience*. 9: 68-74.
- Matmaroh, K., Benjakul, S., Prodpran, T., Encarnacion, A., Kishimura, H. 2011. Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chemistry*. 129(3): 1179-1186.
- Nagai, T., Suzuki, N. 2000. Isolation of collagen from fish waste material-skin, bone and fins. *Food Chemistry*. 68(3): 277-281.
- Onouma, K., Sootawat, B., Thammarat, K., Hideki, K. 2014. Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food Chemistry*. 155: 264-270.
- Pal, G.K., Suresh, P.V. 2016. Sustainable valorization of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 37: 201-215.
- Pal, G.K., Suresh, P.V. 2017. Comparative assessment of physico-chemical characteristics and fibril formation capacity of thermostable carp scales collagen. *Materials Science and Engineering*. 70(1): 32-40.
- Pal, G.K., Nidheesh, T., Suresh, P.V. 2015. Comparative study on characteristics and in vitro fibril formation ability of acid and pepsin soluble collagen from the skin of catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*). *Food Research International*. 76(3): 804-812.
- Plepis, A.M.D.G., Goissis, G., Das-Gupta D.K. 1996. Dielectric and Pyroelectric Characterization of Anionic and Native Collagen. *Polymer Engineering & Science*. 36(24): 2932-2938.
- Rashidy, A.A., Ahmed, G., Abd, E.H.G., Abu, H., Shaymaa, I., Habib., Badr, N.A., Badr, A. 2015. Chemical and biological evaluation of Egyptian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish scale collagen. *International Journal of Biological Macromolecules*. 79: 618-626.
- Serrano, G., Velásquez, L. 2011. Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (*Oreochromis sp*) y cachama (*Piaractus brachypomus*). Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.
- Slimane, E.B., Sadok, S. 2018. Collagen from cartilaginous fish by-products for a potential application in bioactive film composite. *Marine Drugs*. 16(6): 211.
- Solari, A., Cordova, J.S. 2015. Extracción de Colágeno proveniente de residuos del Procesamiento de (*Engraulis ringes*) "Anchoveta". *Ciencia e Investigación*. 18(2): 65-68.
- Sun, L., Hou, H., Li, B., Zhang, Y. 2017. Characterization of acid-and pepsin-soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Biological Macromolecules*. 99: 8-14.
- Tamilmozhi, S., Veeruraj, A., Arumugam, M. 2015. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*). *Food Research International*. 54(2): 1499-505.
- Tan, Y., Chang, S.K.C. 2018. Isolation and characterization of collagen extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. *Food Chemistry*. 242(1): 147-155.
- Thuy, M.L.T., Okazaki E., Osako, K. 2014. Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam. *Food Chemistry*. 149: 264-270.
- Välmaa, A.L., Mäkinen, S., Mattila, P., Marnila, P., Pihlanto, A., Mäki, M., Hiidenhovi, J. 2019. Fish and fish side streams are valuable sources of high-value components. *Food Quality and Safety*. 3(4):209-226.
- Vázquez, O., Caire, F.A., Higuera, C.G., Hernández, W.G. 1997. High performance liquid chromatographic determination of free amino acids in Shrimp. *Journal Liquid Chromatography*. 18(10): 2059-2068.
- Veeruraj, A., Arumugam, M., Balasubramanian, T. 2013. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). *Process Biochemistry*. 48: 1592-1602.
- Veeruraj, A., Arumugam, M., Ajithkumar, T., Balasubramanian, T. 2015. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*). *Food Hydrocolloids*. 43: 708-716.
- Wang, J., Pei, X., Liu, H., Zhou, D. 2017. Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *International Journal of Biological Macromolecules*. 106: 544-550.

- Yang, Y., Li, C., Song, W., Wang, W., Qian, G. 2016. Purification, optimization and physicochemical properties of collagen from soft-shelled turtle calipash. *International Journal of Biological Macromolecules*. 89: 344-352.
- Yousefi, M., Ariffin, F., Huda, N. 2017. An alternative source of type I collagen based on by-product with higher thermal stability. *Food Hydrocolloids*. 63: 372-382.
- Yuqing, T., Sam, K. C., Chang. 2017. Isolation and characterization of collagen extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. *Food Chemistry*. 242: 147-155.
- Zamorrano-Apodaca, J.C., Garcia-Sifuentes, C.O., Carvajal-Millán, E., Vallejo-Galland, B., Scheuren-Acevedo, S.M., Lugo-Sánchez, M.E. 2020. Biological and functional properties of peptide fractions obtained from collagen hydrolysate derived from mixed by-products of different fish species. *Food Chemistry*. 331: 127350.
- Zhang, J., Duan, R. 2017. Characterization of acid-soluble and pepsin-solubilized collagen from frog (*Rana nigromaculata*) skin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 101: 638-642.
- Zhang, J., Duan, R., Huang, L., Song, Y., Regenstein, J.M. 2014. Characterization of acid-soluble and pepsin-solubilized collagen from jellyfish (*Cyanea nozakii Kishinouye*). *Food Chemistry*. 150: 22-26.
- Zhu, S., Yuan, Q., Yang, M., You, J., Yin, T., Gu, Z., Hu, Y., Xiong, S. 2019. A quantitative comparable study on multi-hierarchy conformation of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Materials science and engineering*. 96: 446-457.



Partición de proteína de lactosuero en un sistema de extracción acuosa en dos fases

Whey protein partitioning in aqueous two-phase systems

Salvador Valle-Guadarrama¹, Ricardo Domínguez-Puerto^{2*}, Diana Guerra-Ramírez²

¹ Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México-Texcoco. C.P. 56230, Texcoco, Estado de México.

² Laboratorio de Productos Naturales. Departamento de Preparatoria Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México-Texcoco. C.P. 56230, Texcoco, Estado de México.

RESUMEN

El lactosuero es un subproducto de la fabricación de queso que contiene proteínas que pueden recuperarse, pero están muy diluidas y en mezcla con lactosa, lo que limita su aprovechamiento. La técnica de extracción acuosa en dos fases (ATPE, por sus siglas en inglés) es un procedimiento con potencial para separar proteínas. El objetivo fue evaluar el comportamiento de un sistema de extracción acuosa proteína-(NH₄)₂SO₄ aplicado para la recuperación de proteínas de lactosuero, atendiendo la reducción de lactosa. Se construyó un diagrama binodal de fases mediante una técnica de inspección de alto rendimiento. Se prepararon soluciones de (NH₄)₂SO₄ en concentraciones entre 22 y 40 % usando lactosuero como disolvente. El volumen de la fase superior de los sistemas fue menor que el de la inferior, pero el incremento de (NH₄)₂SO₄ causó aumento gradual de la fase superior. La proteína de lactosuero se concentró en mayor cantidad en la fase superior alrededor del 80 %, en tanto que más del 79 % de la lactosa se separó en la fase inferior. La técnica de ATPE tiene potencial para separar proteínas del lactosuero y la mejor alternativa se basa en sistemas con 34 % de (NH₄)₂SO₄.

Palabras clave: ATPE, inspección de alto rendimiento, sistemas proteína/(NH₄)₂SO₄, proteínas de lactosuero, separación de lactosa.

ABSTRACT

Whey is a by-product of cheese manufacturing that has proteins that can be recovered, but they are very diluted and in a mixture with lactose, which limits their use. The aqueous two-phase extraction technique (ATPE) is a procedure with potential to separate proteins. The objective was to evaluate the behavior of an aqueous protein-(NH₄)₂SO₄ extraction system applied for the recovery of whey proteins, considering the reduction of lactose. A binodal phase diagram was constructed using a high throughput screening technique. Ammonium sulfate was dissolved at concentrations between 22 and 40 % using whey as solvent. The volume of the top phase of the systems was less than that of the bottom one, but the increase in (NH₄)₂SO₄ caused a gradual increase at the top phase. Around 80 % of whey protein concentrated at the top phase, while over 79 % of lactose was at the bottom phase. The ATPE technique has the potential to separate proteins

from whey and the best alternative is based on systems with 34 % (NH₄)₂SO₄.

Key words: ATPE, high throughput screening, lactose separation, protein/(NH₄)₂SO₄ systems, whey proteins.

INTRODUCCIÓN

El lactosuero es el residuo que permanece después de la recuperación de la cuajada enzimática o ácida en la producción de queso (Yadav *et al.*, 2015). De 10 kg de leche, se producen generalmente de 8 a 9 kg de lactosuero, con composición (p/p) de 93.0-94.0 % de humedad, 4.5-6.0 % de lactosa, 0.6-1.1 % de proteína, 0.8-1.0 % de minerales, 0.05-0.90 % de ácido láctico y 0.05-0.06 % de grasas (Prazeres *et al.*, 2012). Las proteínas de mayor presencia son α-lactoalbúmina (α-LA), β-lactoglobulina (β-LG) y albúmina de suero bovino (BSA) con 60, 30 y 6 % de la proteína total, respectivamente (Capezio *et al.*, 2005). La proteína de lactosuero es rica en aminoácidos ramificados y esenciales, péptidos funcionales, antioxidantes e inmunoglobulinas, los cuales pueden reducir el riesgo de contraer distintas asociadas a problemas cardiovasculares, hipertensión, obesidad, diabetes y cáncer (Patel, 2015). Debido a la importancia de estas proteínas es necesario aplicar alguna estrategia que permita aprovecharlas en la fortificación de alimentos, además de que con ello se reduce un problema de contaminación ambiental derivado del desecho del lactosuero.

La extracción acuosa en dos fases (ATPE, por sus siglas en inglés) es un procedimiento de separación líquido-líquido de diversos tipos de biomoléculas, donde se utilizan mezclas de compuestos que en ciertas concentraciones producen una solución verdadera en una sola fase, pero en otras generan la formación de dos fases inmiscibles, entre las cuales se reparten los compuestos a separar (Raja *et al.*, 2011). El caso más común involucra el uso de un polímero como polietilenglicol, dextrano (Rosa *et al.*, 2010), polivinil pirrolidona (Sadeghi y Maali, 2016), polióxido de etileno o polióxido de propileno (da Rocha *et al.*, 2011) y una sal, como sulfato de amonio (Domínguez-Puerto *et al.*, 2018), citrato de sodio (Rodríguez-Salazar y Valle Guadarrama, 2019) o fosfato de potasio (Alcântara *et al.*, 2011). En la formación del sistema bifásico está involucrado un fenómeno de exclusión salina o *salting-out*, donde a medida que aumenta la concentración de sal se reduce la interacción del segundo componente con

*Autor para correspondencia: Ricardo Domínguez Puerto
Correo electrónico: rdominguezp@chapingo.mx

Recibido: 30 de marzo de 2020

Aceptado: 3 de agosto de 2021

el agua, reduciendo su hidrofiliidad y dando lugar a una separación de dos fases inmiscibles (Gomes *et al.*, 2017).

La técnica de ATPE ha sido probada con éxito para la separación de proteínas a partir de distintos materiales, tanto de origen vegetal (Balasubramaniam *et al.*, 2003), como animal (Domínguez-Puerto *et al.*, 2018; Kalaivani y Regupathi, 2015). Diversos trabajos se han enfocado a la separación de las proteínas del lactosuero mediante extracción acuosa en dos fases, con sistemas basados en polietilenglicol (PEG) y citrato de sodio (Perumalsamy y Murugesan, 2012), PEG y poliácido de sodio (Pereira Alcântara *et al.*, 2014), PEG y citrato de sodio (Kalaivani y Regupathi, 2015), PEG y sulfato de amonio (Domínguez-Puerto *et al.*, 2018), poli(etilenglicol-ran-propilenglicol)monobutíler y fosfato de potasio (Jiang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2016), polivinil pirrolidona y fosfato de potasio (Mokhtarani *et al.*, 2011) y PEG en mezcla con fosfato de potasio (Nandini y Rastogi, 2011), entre otros. Domínguez-Puerto *et al.* (2018) resaltaron que el lactosuero contiene también concentraciones relativamente altas de lactosa, lo cual debe ser atendido al recuperar las proteínas, pues muchas personas padecen de intolerancia a este disacárido (Jelen y Tossavainen, 2003). Domínguez-Puerto *et al.* (2018) también postularon que, por su estructura química, las proteínas pueden actuar por sí mismas como fase polimérica en un sistema de extracción acuosa en dos fases, para cumplir el objetivo de su separación del lactosuero. A este respecto, se ha reportado el uso de sistemas ATPE con proteínas en mezcla con polisacáridos, donde éstos actúan como agentes inductores del efecto de exclusión salina (Jara y Pilosof, 2011). Asimismo, se ha reportado que el incremento en el nivel de sacarosa en un sistema polisacárido-proteína ha favorecido la compatibilidad termodinámica de las mezclas y permitido la formación de una fase rica en proteína y, por ende, la separación de ésta (Sadeghi *et al.*, 2021). Por otro lado, el sulfato de amonio (AS, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) es una sal comúnmente usada para la precipitación y estabilización de proteínas (Duong-Ly y Gabelli, 2014; Yang *et al.*, 2010), que actúa, en forma similar a compuestos como los polisacáridos, por medio de un fenómeno de exclusión salina. Sin embargo, hasta hoy la partición de la proteína del lactosuero en un sistema proteína/sulfato de amonio no ha sido reportado, por lo cual el objetivo del trabajo fue evaluar el comportamiento de un sistema de extracción acuosa proteína- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aplicado para la recuperación de proteínas de lactosuero, atendiendo la reducción de lactosa

MATERIALES Y MÉTODOS

Lactosuero

Se obtuvo lactosuero mediante filtrado de la cuajada resultante en un proceso de fabricación de queso panela a partir de leche entera de ganado Holstein, utilizando el método descrito por Lobato-Calleros *et al.* (2009). El suero se mantuvo en congelación a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y porciones de éste fueron separadas periódicamente para el desarrollo experimental. El lactosuero se evaluó con equipo Milko Scan FT1 (Foss, Denmark) y tuvo $0.715\text{ }(\pm 0.038)\%$ de grasa, $13.1\text{ }(\pm 0.58)\text{ mg mL}^{-1}$ de proteína y $49.5\text{ }(\pm 7.56)\text{ mg mL}^{-1}$ de azúcares.

Diagrama binodal de fases

Se construyó un diagrama binodal de fases utilizando sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; AS), agua destilada y lactosuero como fuente de proteína. Se utilizó la técnica de inspección de alto rendimiento (HTS; *high throughput screening*) (Bensch *et al.*, 2007, Spyropoulos *et al.*, 2010) con modificaciones. Se eligieron ocho intervalos de concentración de AS, en rangos de 14.0-20.0 (denominado R1), 15.0-21.0 (R2), 16.0-22.0 (R3), 18.0-24.0 (R4), 20.0-26.0 (R5), 22.0-28.0 (R6), 24.0-30.0 y 30.0-36.0 % (R8). En cada intervalo la concentración de proteína se mantuvo constante con valores de 0.91, 0.55, 0.36, 0.18, 0.09, 0.045, 0.018, y $9.68 \times 10^{-3}\%$, respectivamente (Figura 1). Cada sistema se dejó en reposo durante 24 h, tras lo cual se identificó la formación de un sistema en una o dos fases separadas. En cada intervalo (R1 a R8) se identificó la mezcla o sistema con menor concentración de AS que formó un sistema bifásico. Los estados identificados se rotularon con la notación B1 a B8, respectivamente, se usaron para construir una curva binodal de fases y, asimismo, para delimitar las regiones monofásica y bifásica. Las concentraciones de AS y proteína de los estados B1 a B8 se ajustaron a la Ecuación 1 (Merchuk *et al.*, 1998) por medio de regresión no lineal usando el software Matlab (The Mathworks Inc., 1990-2008), donde x_{AS}^{bin} (%) y y_{pro}^{bin} (%) son concentraciones de equilibrio de AS y proteína sobre la curva binodal y k_1 , k_2 y k_3 son constantes de regresión. Todas las rutinas experimentales se realizaron a $25\text{ }^\circ\text{C}$.

$$y_{pro}^{bin} = k_1 e^{(k_2(x_{AS}^{bin})^{0.5} - k_3(x_{AS}^{bin})^3)} \quad (1)$$

El diagrama de fases se completó con una línea de operación (TL) en la región bifásica a través de la preparación de disoluciones de sulfato de amonio (AS) en concentra-

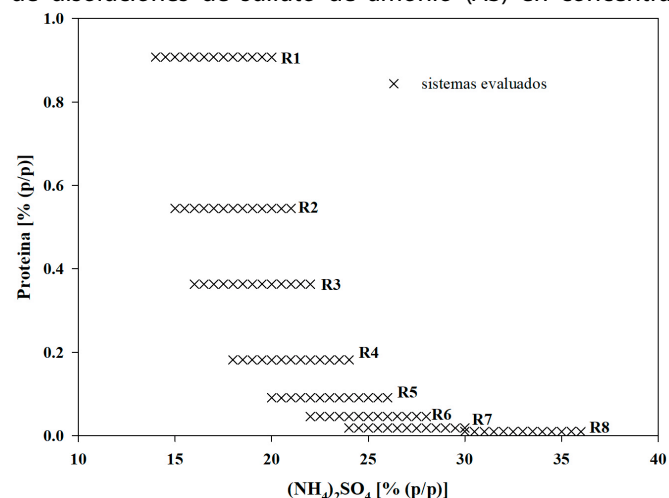


Figura 1. Sistemas evaluados para encontrar la línea binodal. Concentraciones AS/proteína (%/%) : R1= 14-20 /0.91; R2= 15-21 /0.55; R3= 16-22 /0.36; R4= 18-24 /0.18; R5= 20-26 /0.09; R6= 14-20 /0.045; R7= 20-30 /0.018; R8= 14-20 /9.68x10⁻³.

Figure 1. Evaluated systems to locate binodal curve. AS/protein concentrations (%/%) : R1= 14-20 /0.91; R2= 15-21 /0.55; R3= 16-22 /0.36; R4= 18-24 /0.18; R5= 20-26 /0.09; R6= 14-20 /0.045; R7= 20-30 /0.018; R8= 14-20 /9.68x10⁻³.

ciones de 22, 26, 30, 34, 36, 38 y 40 %, usando lactosuero como disolvente. Estas mezclas se rotularon como P1 a P7, respectivamente. Con base en la concentración original del lactosuero se determinó la concentración de proteína en cada una de las mezclas. Los datos se ajustaron a la Ecuación (2) y el resultado se graficó sobre el diagrama de fases, donde y_{pro}^{TL} es concentración de proteína, x_{AS}^{TL} es concentración de sulfato de amonio y k_4 y k_5 son constantes de regresión.

$$y_{pro}^{TL} = k_4 + k_5 x_{AS}^{TL} \quad (2)$$

Parámetros de partición

Los volúmenes de las fases superior (V_T , mL) e inferior (V_B , mL) se midieron con una probeta. Con ellos se determinó la relación de volúmenes (R), como el cociente de V_T entre V_B (Ecuación 3), para las condiciones de operación localizadas sobre la línea TL.

$$R = \frac{V_T}{V_B} \quad (3)$$

Cada mezcla se mantuvo en reposo a 25 °C durante 24 h para permitir la formación de sistemas bifásicos. Posteriormente, las fases se separaron y se evaluaron en términos de concentración de proteína y concentración de lactosa. Para cada componente se determinó un coeficiente de partición (K) mediante la Ecuación (4) y rendimientos de separación (Y_T , Y_B) en las fases superior (T) e inferior (B) con las Ecuaciones (5) y (6), respectivamente, donde c_T , c_B y c_0 son concentraciones (mg mL^{-1}) de proteína o lactosa en T , en B y en el lactosuero original, respectivamente. Asimismo, V_0 es el volumen (mL) de lactosuero adicionado.

$$K = \frac{c_T}{c_B} \quad (4)$$

$$Y_T (\%) = \left(\frac{c_T V_T}{c_0 V_0} \right) \times 100 \quad (5)$$

$$Y_B (\%) = \left(\frac{c_B V_B}{c_0 V_0} \right) \times 100 \quad (6)$$

Evaluación de variables

La concentración de proteína se determinó con el método de absorción a 220 nm (Kamizake *et al.*, 2003), con un espectrofotómetro Hach DR 5000 UV-Vis (Hach, México). Las determinaciones se apoyaron con una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) en un rango de 10 a 80 mg mL^{-1} y los resultados se expresaron como mg equivalentes de BSA por mL (mg BSA mL^{-1}). La concentración de lactosa se midió con el método de fenol-sulfúrico (DuBois *et al.*, 1956), en un espectrofotómetro con lector de microplacas (Biotek, Sinergy 2, BioTeck Instruments, USA) y usando una curva estándar de lactosa en el rango de 10 a 200 mg mL^{-1} .

Análisis de datos

Los datos de relación de volúmenes (R), concentración de proteína y lactosa en las fases, rendimientos de separación (Y_T , Y_B) y coeficiente de partición (K) se sometieron a análisis de varianza y a pruebas de comparación de medias mediante el estadístico de Tukey con nivel de significancia de 0.05. Se usó el Programa SAS (SAS Institute Inc., 1999) como apoyo para el análisis de datos. Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diagrama binodal de fases

El método de inspección de alto rendimiento (HTS) permitió verificar que, para valores constantes de contenido de proteína, el incremento de la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ causó la transición de sistemas monofásicos a sistemas donde se observó la separación en dos fases. El suero tuvo contenido de proteína de 1.21 (± 0.05) %, con lo cual se calculó el contenido proteico de todas las mezclas evaluadas. Los puntos binodales identificados tuvieron concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /proteína (%/%) de 18.25/0.9075 (B1), 19.50/0.5445 (B2), 21.00/0.3630 (B3), 22.50/0.1815 (B4), 23.50/0.0908 (B5), 24.50/0.0460 (B6), 26.00/0.0182 (B7) y, 34.00/9.68 $\times 10^{-3}$ (B8) (Figura 1). Con estos datos se ajustó la curva binodal (Ecuación 2) con valores de 18.98, -0.3095, 2.852 $\times 10^{-4}$ en las constantes k_1 , k_2 y k_3 , respectivamente y coeficiente de determinación (r^2) igual a 0.9903 (Figura 2). Por otro lado, el límite de solubilidad del sulfato de amonio es 43.4 % a 25 °C (Wingfield, 2016). En tal sentido, la curva binodal se extrapoló, mediante la Ecuación (2), hasta la concentración de sulfato de amonio de 40 %, de donde se identificó el estado B9 con concentración de proteína de 8.80 $\times 10^{-3}$ % (Figura 2).

El diagrama binodal de fases se completó con la construcción de una línea de operación en la región bifásica. Las condiciones usadas tuvieron concentración AS/proteína (%/%) de 22/0.94 (P1), 26/0.90 (P2), 30/0.85 (P3), 34/0.80 (P4),

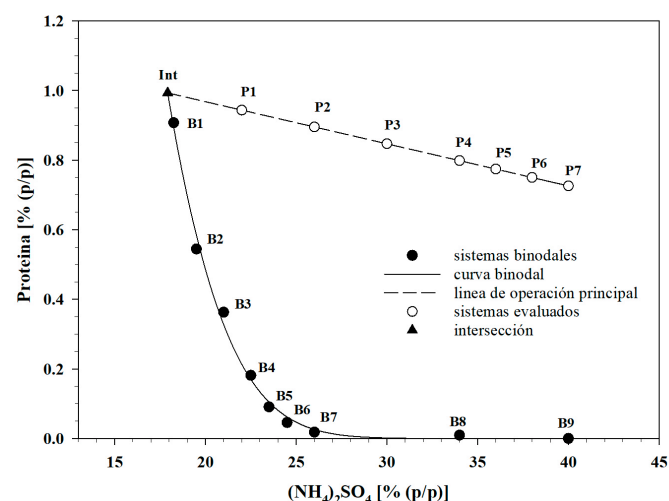


Figura 2. Diagrama de fases con curva binodal y sistemas experimentales evaluados.

Figure 2. Phases diagram with binodal curve and evaluated experimental systems.

36/0.77 (P5), 38/0.75 (P6) y 40/0.73 % (P7) (Figura 2). El ajuste de estos datos a la Ecuación 2 tuvo constantes de regresión k_4 y k_5 de 1.2083 % y 0.0120, respectivamente, y coeficiente de determinación (r^2) igual a 0.9979. Las Ecuaciones 1 y 2 se resolvieron simultáneamente y se determinó la intersección (Int, Figura 2) entre ellas en la condición con 17.9262 % de sulfato de amonio y 0.9932 % de proteína. En la Figura 3 se compara la línea binodal obtenida con PEG4000 y sulfato de amonio por Domínguez-Puerto *et al.* (2018) con la línea binodal para el sistema proteína-(NH₄)₂SO₄ obtenida en este trabajo, las cuales se diferenciaron en el hecho de que en la primera se utilizó agua como disolvente (línea sólida), en tanto que para la segunda se usó lactosuero más agua (línea punteada). La curva binodal obtenida con proteína tuvo rango de concentración de 17.92 a 40.00 % de (NH₄)₂SO₄, mientras que la obtenida con PEG4000, el rango fue de 3.46 a 34.71 %. En la Figura 3 se muestran las condiciones de operación evaluadas en el presente trabajo (P1 a P7), y condiciones identificadas por los puntos 1 a 7, las cuales fueron evaluadas para el sistema PEG4000/AS por (Domínguez-Puerto *et al.*, 2018), quienes encontraron que a medida que se redujo la concentración de PEG en el sistema se incrementó la concentración de proteína en la fase superior y recomendaron el uso de sistemas sin PEG y concentración de (NH₄)₂SO₄, de 34.0 % para conseguir rendimientos de separación de proteína mayores a 92 %. A este respecto, los datos del presente trabajo mostraron que la recomendación de Domínguez-Puerto *et al.* (2018) coincidió con la intersección de las líneas de operación evaluadas en ambos trabajos (Figura 3). Asimismo, el hecho de que la curva de operación evaluada en el presente trabajo se ubicó en la región bifásica, confirmó que la separación de proteínas de lactosuero puede realizarse sin el uso de un polímero como polietilenglicol y que las proteínas, por su estructura química, pueden por sí mismas fungir como componente polimérico en su separación.

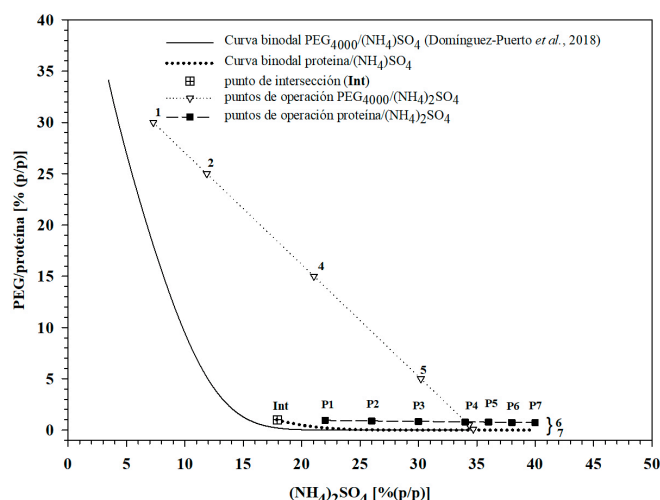


Figura 3. Comparación de curvas binodales entre los sistemas (NH₄)₂SO₄/PEG₄₀₀₀ (1, 2, 4, 5, 6 y 7) y proteína/(NH₄)₂SO₄ (P1 a P7) y sus respectivos puntos de operación.

Figure 3. Binodal curves comparison between (NH₄)₂SO₄/PEG₄₀₀₀ (1, 2, 4, 5, 6 y 7) and protein/(NH₄)₂SO₄ (P1 a P7) systems and their corresponding operation points.

Por otro lado, la curva binodal del sistema proteína/(NH₄)₂SO₄, resultó desplazada hacia la derecha con relación a la curva binodal construida con PEG4000/(NH₄)₂SO₄. Este fenómeno pudo ocurrir debido a que la proteína tiene menor solubilidad en agua en comparación con el polietilenglicol, el cual tiene un grupo funcional éter (metoxi) de manera periódica en su estructura y puede ligar de dos a tres moléculas de agua por unidad (Turecek *et al.*, 2016), lo que lo hace altamente soluble. Sin embargo, aunque las proteínas del lactosuero son solubles, la interacción con el agua es menor y poseen una estructura mayor con pesos moleculares del orden de 14, 18 y 66 kDa para α-LA, β-LG y BSA, respectivamente (Madureira *et al.*, 2007), que contrasta con el caso del polietilenglicol, cuyo valor es de 4 kDa para PEG4000.

Relación de separación de volúmenes

La relación entre los volúmenes separados (R) varió en forma sigmoideal (Figura 4) y los datos se ajustaron bien ($r^2=0.9802$) a la Ecuación 7, donde k_6 , k_7 , k_8 y k_9 son constantes de regresión que tuvieron valores de 0.0619, 32.7401, 2.4499 y 0.2953, respectivamente y es concentración de sulfato de amonio.

$$R = k_6 + k_7 e^{-e^{-\left(\frac{x_{AS}-k_8}{k_9}\right)}} \quad (7)$$

El valor de R se mantuvo constante en los sistemas P1 a P3, con valor aproximado de 0.06, sin diferencia significativa entre ellos y con un volumen en la fase inferior que fue 16 veces mayor que en la fase superior. Entre los estados P3 y P6 el valor de R aumentó significativamente hasta valores de 0.30 y 0.35 en las condiciones P6 y P7, sin diferencia significativa entre estas dos últimas (Figura 4), lo que sugirió que el efecto de la composición sobre la relación de volúmenes dejó de ser significativo a partir de una concentración de sulfato de amonio de 38 %, lo cual se explica por el acercamiento a la

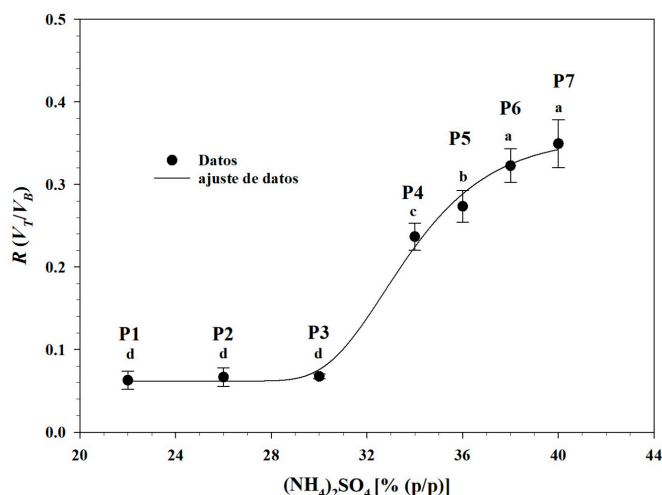


Figura 4. Volúmenes de separación de los sistemas experimentales proteína/sulfato de amonio. Letras diferentes indican diferencias significativas, de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Figure 4. Volume ratio of experimental operation points of the protein/ammonium sulphate systems. Different letters indicate significant differences, according to Tukey's test ($p < 0.05$).

condición de saturación del sulfato de amonio, con valor de 43.4 % (Wingfield, 2016). Por otro lado, la relación de volúmenes normalmente disminuye a medida que disminuye la presencia del componente polimérico y aumenta el componente salino en el sistema ATPE (Raja *et al.*, 2011), lo cual contrastó con el comportamiento observado en el presente trabajo. La formación del sistema bifásico está determinada por un fenómeno de exclusión salina o *salting-out* (Gomes *et al.*, 2017). En el presente trabajo, a medida que aumentó la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se incrementó la interacción ion-dipolo entre esta sal y el agua, con lo cual se incrementó el carácter hidrofóbico de las proteínas (Murillo-Martínez *et al.*, 2013) y con ello su exclusión (efecto *salting-out*), dando lugar a una fase separada proteínica. Sin embargo, el aumento de la relación de volúmenes (R) sugirió que otros componentes quedaron también alojados en esa fase y causaron flujo de agua hacia la fase superior.

Concentración de proteína

La concentración de proteína osciló de 48.63 a 30.08 mg mL^{-1} y de 6.56 a 2.02 mg mL^{-1} en las fases superiores e inferiores de los sistemas, respectivamente, durante la transición de la condición P1 a la P7 (Figura 5). La diferencia entre ambas fases fue significativa ($p \leq 0.05$), lo que confirmó que la proteína tendió a migrar hacia la fase superior y que ésta se formó por el efecto de exclusión salina causado por el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Este hecho fue más evidente en la transición entre los estados P1 y P3, donde la concentración de proteína se redujo en la fase inferior y aumentó en la superior y donde la relación de volúmenes no cambió, es decir, que las dimensiones volumétricas de la fase superior en relación con la inferior no se modificaron (Figura 4). Aunque el volumen de la fase inferior disminuyó en relación con el de la fase superior entre los estados P3 y P7, la concentración de proteína continuó disminuyendo en la fase inferior a medida que aumentó el

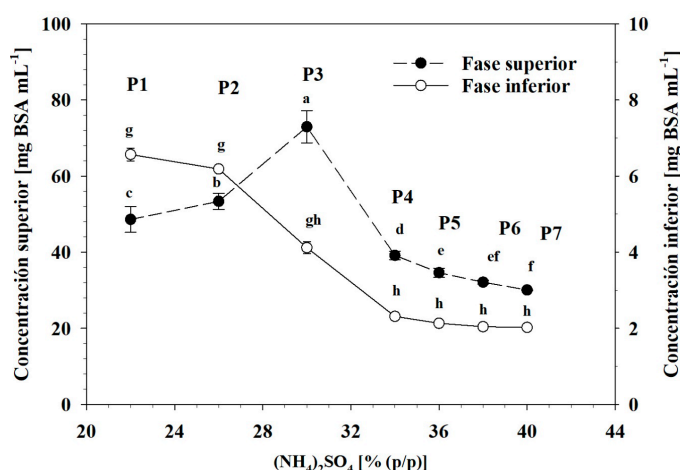


Figura 5. Concentración de proteína en la fase superior e inferior de los sistemas evaluados. Letras diferentes indican diferencias significativas, de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Figure 5. Top and bottom phase protein concentration of evaluated operation points. Different letters indicate significant differences, according to Tukey's test ($p < 0.05$).

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Sin embargo, en la fase superior la concentración de proteína disminuyó también en el mismo rango de variación del sulfato de amonio, pero el comportamiento fue más bien causado por un efecto de dilución, pues el volumen de esa fase aumentó a medida que aumentó la presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Con base en estos datos, el coeficiente de partición de proteína entre las fases (K_{pro}) aumentó de 7.42 a 17.74 en la transición de P1 a P3 (Figura 6), aunque en la región de P3 a P7 este valor se redujo a 14.86, derivado del efecto de dilución de la fase superior.

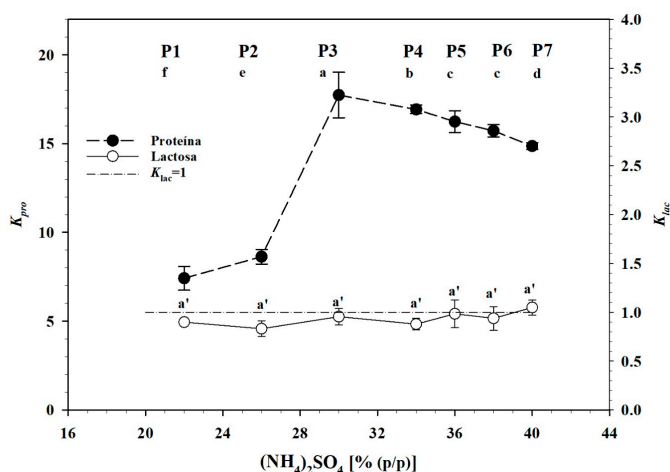


Figura 6. Coeficiente de partición para los sistemas evaluados. Letras diferentes indican diferencias significativas, de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Figure 6. Partitioning coefficient for evaluated operation points. Different letters indicate significant differences, according to Tukey's test ($p < 0.05$).

Concentración de lactosa

La concentración de lactosa osciló entre 36.72 y 40.62 mg/mL en las fases superiores y entre 38.06 y 47.06 mg/mL en las fases inferiores de los sistemas evaluados sobre la línea de operación (Figura 7). La diferencia de concentración de lactosa entre fases no fue significativa en las condiciones P3 a P7, y aunque sí lo fue en los casos P1 y P2, en realidad no tuvo importancia práctica. La relación de la concentración de un compuesto en la fase superior y la concentración de éste en la fase inferior está determinada por el coeficiente de partición (K ; Ecuación 4), donde un valor mayor a 1 indica mayor concentración del compuesto en la fase superior, en tanto que un valor menor a la unidad indica mayor concentración en la fase inferior. El coeficiente de partición de lactosa (K_{lac}) fue 0.902 (± 0.01) en P1, 0.836 (± 0.030) en P2, 0.944 (± 0.029) en P3, 0.880 (± 0.023) en P4, 1.005 (± 0.049) en P5, 0.952 (± 0.043) en P6 y 1.040 (± 0.027) en P7. Estos valores indicaron que la lactosa se obtuvo con concentración sólo ligeramente mayor en la fase inferior que en la fase superior de los sistemas y que no hubo una tendencia a que este disacárido se concentrará de forma clara en alguna de las fases, sino que quedó aparentemente repartido entre ambas, con concentración aproximadamente similar. Domínguez-Puerto *et al.* (2018) reportaron valores promedio de K_{lac} de 0.58 en sistemas basados en polietilenglicol 4000 y sulfato de amo-

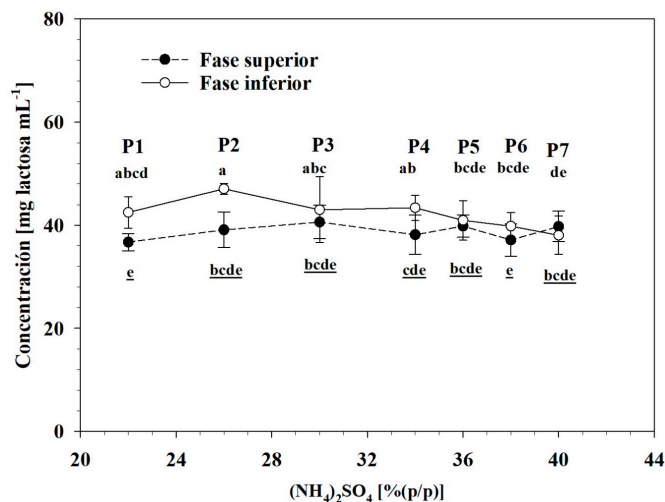


Figura 7. Concentración de lactosa en la fase superior e inferior de los sistemas evaluados (letras subrayadas indican fase inferior correspondiente). Letras diferentes indican diferencias significativas, de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Figure 7. Lactose concentration at top and bottom phases from evaluated operation points (underlined words indicate corresponding bottom phase). Different letters indicate significant differences, according to Tukey's test ($p < 0.05$).

nio y encontraron que el valor de este parámetro disminuyó a medida que la concentración del polímero también disminuyó, lo que indicó que en ese sistema la lactosa migró de la fase superior a la fase inferior de los sistemas. Suarez Ruiz *et al.* (2020) señalaron que azúcares como la glucosa migran hacia la fase más hidratada o con más agua disponible (frecuentemente la fase inferior) en un sistema polímero/sal. Al respecto, al demandar menor agua disponible que el PEG, la proteína no indujo un efecto de exclusión sobre la lactosa similar al de este polímero y, por ello, la lactosa se repartió entre ambas fases. Sin embargo, el coeficiente de partición se afecta por el volumen de las fases y se requiere una valoración de las cantidades absolutas que se obtuvieron en cada fase con base en los rendimientos de separación.

Rendimientos de separación

El rendimiento de separación de proteína en la fase superior (Y_{pro}^{top}) varió de 31.77 a 83.82 % con la transición entre los estados P1 y P7 y con un comportamiento sigmoide (Figura 8). A medida que se incrementó la concentración de $(NH_4)_2SO_4$ se incrementó el efecto de exclusión salina de este compuesto sobre la proteína (Gomes *et al.*, 2017), con lo cual mayores cantidades de proteína de lactosuero se separaron en la fase superior. Este efecto de exclusión salina fue moderado en la transición de los estados P1 a P2, lo que indicó que con concentraciones de $(NH_4)_2SO_4$ entre 22 y 26 % la solubilidad de las proteínas no se vio significativamente afectada, pero entre 26 y 34 % el efecto de exclusión salina se incrementó de forma muy importante y, para concentraciones mayores de la sal, el incremento en la separación de estos compuestos en la fase superior fue moderado.

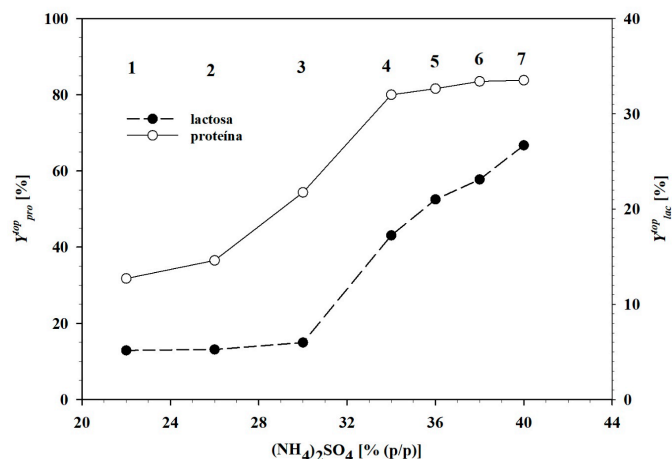


Figura 8. Rendimiento para la fase superior de los sistemas experimentales evaluados. a) relación entre el rendimiento en la fase superior para lactosa y proteína con el porcentaje de volumen. b) Relación entre la concentración de sulfato de amonio con el rendimiento de lactosa y proteína en la fase superior.

Figure 8. Yield of top and bottom phase of evaluated operation points. a) Relation between top phase lactose and protein yield, and volume percentage. b) Top phase relation between ammonium sulphate concentration, and lactose and protein yield.

El rendimiento de separación de lactosa en la fase superior de los sistemas (Y_{lac}^{top}) presentó valores entre 5.16 y 5.98 % en los sistemas P1 a P3, pero registró un incremento en la transición de P3 a P7 hasta valores cercanos a 29 % (Figura 8), lo que indicó que la recuperación de lactosa en la fase inferior de los sistemas P1 a P3 varió entre 94.02 y 94.84 % y se redujo hasta valores cercanos a 71 % con la transición de P3 a P7. En tal sentido, aunque el coeficiente de partición tuvo valores cercanos a la unidad, el rendimiento de separación indicó que las mayores cantidades absolutas de lactosa permanecieron en la fase inferior, en forma también congruente a lo reportado por Domínguez-Puerto *et al.* (2018).

Con base en un análisis conjunto de separación de proteína en la fase superior y de lactosa en la fase inferior, se encontró que los sistemas P3 y P4 tuvieron el mejor potencial para atender la separación de estos compuestos. El sistema P3 se formó con 30 % de $(NH_4)_2SO_4$ y permitió que el 54.4 % proteína y el 5.98 % de lactosa del lactosuero se separaron en la fase superior, en tanto que con el sistema P4, formado por 34 % de $(NH_4)_2SO_4$, el 80.01 % de proteína y 17.22 % de lactosa se separaron en la misma fase. Sin embargo, en virtud de que el principal objetivo es recuperar la proteína del lactosuero, se aceptó que el mejor sistema para cumplir este propósito fue el que contuvo 34 % de sulfato de amonio (P4), lo cual coincidió con el reporte de Domínguez-Puerto *et al.* (2018). Con esta base, el uso de la técnica de extracción acuosa en dos fases tiene potencial para recuperar proteínas del lactosuero y el uso posterior de éstas en estrategias de fortificación de alimentos.

CONCLUSIONES

El sistema $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /proteína puede formar sistemas bifásicos acuosos con concentraciones de sulfato de amonio mayores a 22 %. La separación mostró sistemas donde el volumen de la fase superior fue significativamente mayor al de la fase inferior, pero el incremento de la concentración de sal causó que el volumen de la fase superior aumentara con relación al de la inferior. La proteína de lactosuero se concentró en mayor cantidad en la fase superior que en la inferior y por ello, la estrategia de mezclar lactosuero con sulfato de amonio constituyó una alternativa viable para recuperar las proteínas en porcentajes mayores al 80 %. Aunque la lactosa mostró concentraciones similares en ambas fases, el desarrollo de sistemas con volumen en fase superior menor al de la fase inferior permitió que aproximadamente 79 % de este disacárido fuera separado en la fase inferior. La técnica de extracción acuosa en dos fases tiene potencial para separar proteínas del lactosuero con objeto de que éstas se utilicen en estrategias de fortificación de alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Unidad Tecnológica Lechera (UTL) de la Universidad Autónoma Chapingo por las facilidades para el suministro de lactosuero para la realización de esta investigación.

REFERENCIAS

- Alcântara, L.A.P., Minim, L.A., Minim, V.P.R., Bonomo, R.C.F., da Silva, L.H.M., y da Silva, M.D.C.H. 2011. Application of the response surface methodology for optimization of whey protein partitioning in PEG/phosphate aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography B*, 879, 1881–1885. DOI:10.1016/j.jchromb.2011.05.007
- Balasubramaniam, D., Wilkinson, C., Cott, K. V., Zhang, C. 2003. Tobacco protein separation by aqueous two-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 989, 119–129.
- Bensch, M., Selbach, B. y Hubbuch, J. 2007. High throughput screening techniques in downstream processing: Preparation, characterization and optimization of aqueous two-phase systems. *Chemical Engineering Science*, 62, 2011–2021.
- Capezio, L., Romanini, D., Picó, G. A. y Nerli, B. 2005. Partition of whey milk proteins in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol–phosphate as a starting point to isolate proteins expressed in transgenic milk. *Journal of Chromatography B*, 819, 25–31.
- da Rocha, P. P., Barbosa, M. A., Rodrigues, D. L. L., Moreira, M. C. R., y Mendes, S. L. H. Hespanhol, D. S. M. C. 2011. Fluid Phase Equilibria Phase diagram and thermodynamic modeling of PEO + organic salts + H_2O and PPO + organic salts + H_2O aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*, 305, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2011.02.013>
- Domínguez-Puerto, R., Valle-Guadarrama, S., Guerra-Ramírez, D. y Hahn-Schlam, F. 2018. Purification and concentration of cheese whey proteins through aqueous two phase extraction. *CyTA - Journal of Food*, 16, 452–459.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.

- Duong-Ly, K. C. y Gabelli, S. B. 2014. Chapter Seven - Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. In: LORSCH, J. (ed.) *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- Gomes, J., Ferreira, S., Reinert, O., Gandol, R., Ayra, L., Santos, V., *et al.* 2017. Fluid phase equilibria evaluation of salting-out effect in the liquid e liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of 2-propanol and Na_2SO_4 / MgSO_4 at different temperatures. *Fluid Phase Equilibria*, 450, 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.08.001>
- Jara, F. y Pilosof, A. M. R. 2011. Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein concentrate/hydroxypropylmethylcellulose aqueous two-phase systems. *Food Hydrocolloids*, 25, 374–380.
- Jelen, P., y Tossavainen, O. 2003. Low lactose and lactose-free milk and dairy products – prospects, technologies and applications. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58, 161-165.
- Jiang, Bin; Zhang, Xiaoqing; Yuan, Yongqiang; Qu, Yuxiao; Feng, Zhibiao. 2017. Separation of antioxidant peptides from pepsin hydrolysate of whey protein isolate by ATPs of EOPO co-polymer (UCON)/phosphate. *Scientific Reports*, 7 (1), 13320, 1–12. DOI: 10.1038/s41598-017-13507-9
- Kalaivani, S., y Regupathi, I. 2015. Synergistic extraction of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from acid whey using aqueous biphasic system: process evaluation and optimization. *Separation and Purification Technology*, 146, 301–310. doi:10.1016/j.seppur.2015.03.057
- Kamizake, N. K. K., Gonçalves, M. M., Zaia, C. T. B. V. y Zaia, D. A. M. 2003. Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 507–516.
- Lobato-Calleros, C., Lozano-Castañeda, I. y Vernon-Carter, E. J. 2009. Textura y microestructura de quesos tipo panela bajos en grasa y en colesterol: diferentes metodologías. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 1.
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E. y Xavier Malcata, F. 2007. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40, 1197–1211.
- Merchuk, J. C., Andrews, B. A. y Asenjo, J. A. 1998. Aqueous two-phase systems for protein separation: Studies on phase inversion. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 711, 285–293.
- Mokhtarani, B., Mortaheb, H. R., Mafi, M., y Amini, M. H. 2011. Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in aqueous two-phase systems of polyvinylpyrrolidone and potassium phosphate. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 879(11-12), 721–726. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.02.007
- Murillo-Martínez, M. M., Tello-Solís, S. R., García-Sánchez, M. A., y Ponce-Alquicira, E. 2013. antimicrobial activity and hydrophobicity of edible whey protein isolate films formulated with nisin and/or glucose oxidase. *Journal of Food Science*, 78(4), M560–M566. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12078>
- Nandini, K. E., y Rastogi, N. K. 2011. Integrated Downstream Processing of Lactoperoxidase from Milk Whey Involving Aqueous Two-Phase Extraction and Ultrasound-Assisted Ultrafiltration. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163(1), 173–185. DOI: 10.1007/s12010-010-9026-9

- Patel, S. 2015. Emerging trends in nutraceutical applications of whey protein and its derivatives. *Journal of Food Science and Technology*, 52(11), 6847–6858. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1894-0>
- Pereira Alcântara, L. A., Vieira Amaral, I., Ferreira Bonomo, R. C., Mendes da Silva, L. H., Hespanhol da Silva, M. d. C., Rodrigues Minim, V. P., y Minim, L. A. 2014. Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from cheese whey in aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycol) and sodium polyacrylate. *Food and Bioproducts Processing*, 92, 409–415. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.09.006>
- Perumalsamy, M., y Murugesan, T. (2012). Extraction of cheese whey proteins (α -lactalbumin and β -lactoglobulin) from dairy effluents using environmentally benign aqueous biphasic system. *International Journal of Chemical and Environmental Engineering*, 3(1), 50–54.
- Prazeres, A. R., Carvalho, F. y Rivas, J. 2012. Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48–68.
- Raja, S., Murty, V. R., Thivaharan, V., Rajasekar, V. y Ramesh, V. 2011. Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules—a review. *Science and Technology*, 1, 7–16.
- Rodríguez-Salazar, N., y Valle-Guadarrama, S. 2020. Separation of phenolic compounds from roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyces with aqueous two-phase extraction based on sodium citrate and polyethylene glycol or acetone. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 55(13), 2313–2324. <https://doi.org/10.1080/01496395.2019.1634730>
- Rosa, P. A. J., Ferreira, I. F., Azevedo, A. M., y Aires-Barros, M. R. 2010. Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2296–2305. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.034>
- Sadeghi, F., Kadkhodae, R., Emadzadeh, B., y Nishinari, K. 2021. Effect of sucrose on phase and flow behavior of protein-polysaccharide mixtures. *Food Hydrocolloids*, 113(November 2020), 106455. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106455>
- Sadeghi, R., y Maali, M. 2016. Toward an understanding of aqueous biphasic formation in polymer-polymer aqueous systems. *Polymer*, 83, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.11.032>
- SAS Institute, Inc. 1999. SAS/STAT® User's Guide, Version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 3884 p.
- Spyropoulos, F., Portschi, A. y Norton, I. T. 2010. Effect of sucrose on the phase and flow behaviour of polysaccharide/protein aqueous two-phase systems. *Food Hydrocolloids*, 24, 217–226.
- Suarez Ruiz, C. A., Baca, S. Z., Van Den Broek, L. A. M., Van Den Berg, C., Wijffels, R. H. y Eppink, M. H. M. 2020. Selective fractionation of free glucose and starch from microalgae using aqueous two-phase systems. *Algal Research*, 46, 101801.
- The Mathworks, Inc. 1990–2008. Optimization Toolbox™ 4 User's Guide. Natick, Massachusetts, USA: The Mathworks Inc. 575 p.
- Turecek, P. L., Bossard, M. J., Schoetens, F. y Ivens, I. A. 2016. PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105, 460–475.
- Wingfield, P. T. 2016. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. *Current Protocols in Protein Science*, 84, A.3F.1–A.3F.9.
- Yadav, J. S. S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D. y Surampalli, R. Y. 2015. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 33, 756–774.
- Yang, Z., Liu, X.-J., Chen, C. y Halling, P. J. 2010. Hofmeister effects on activity and stability of alkaline phosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804, 821–828.
- Zhang, H., Jiang, B., Feng, Z.-B., Qu, Y.-X., y Li, X. 2016. Separation of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin in Whey Protein Isolate by Aqueous Two-phase System of Polymer/Phosphate. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 44(5), 754–759. DOI: 10.1016/S1872-2040(16)60932-5



Tropical fruits and by-products as a potential source of bioactive polysaccharides

Frutas tropicales y subproductos como fuente potencial de polisacáridos bioactivos

Salma Alejandra Enríquez-Valencia^a, Gustavo A. Gonzalez-Aguilar^a, Leticia X. López- Martínez^{b*}

^a Coordinación de Alimentos de Origen Vegetal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Col. La Victoria, Hermosillo, Sonora, 83304, México. Coordinación de Alimentos de Origen Vegetal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Col. La Victoria, Hermosillo, Sonora, 83304, México.

^b Cátedras CONACYT-Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46, Col. La Victoria, Hermosillo, Sonora, 83304, México.

ABSTRACT

Consumption of tropical fruits is growing around the world, not only due to their flavor and appearance but also for their nutritional value. In addition to the content in macro and micronutrients, tropical fruits contain substantial amounts of bioactive compounds in peels and seeds, which constitute an underexploited source of bioactive compounds such as phenolic acid, polyphenols, carotenoids, vitamin C and polysaccharides. Polysaccharides have attracted growing interest, particularly for their bioactive characteristics such as antioxidants as well as antiinflammatory, antimicrobial, anticoagulant, hepatoprotective and immunomodulatory properties. Therefore, obtaining functional ingredients from tropical fruits and by-products is feasible, and could be used to develop functional and nutraceutical foods to elaborate products of the pharmaceutical industry and food preservation. The present review provides the most relevant information published the last ten years (2010-2020) on bioactive polysaccharides extracted with hot water reported in tropical fruits and by-products and their relationship with potential beneficial health effects.

Keywords: By-products, tropical fruits, polysaccharides, bioactive properties.

RESUMEN

El consumo de frutas tropicales está creciendo en todo el mundo, no solo por su sabor y apariencia, sino también por su valor nutricional. Además del contenido en macro y micronutrientes, las frutas tropicales contienen cantidades sustanciales de compuestos bioactivos en cáscaras y semillas, que constituyen una fuente subexplotada de compuestos bioactivos como ácido fenólico, polifenoles, carotenoides, vitamina C y polisacáridos. Los polisacáridos han atraído un interés creciente, especialmente por sus características bioactivas como antioxidantes y propiedades antihipoglucemiantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, anticoagulantes, hepatoprotectoras e inmunomoduladoras. Por tanto, la obtención de ingredientes funcionales a partir de frutas tropicales y subproductos es factible y podría utilizarse para desarrollar alimentos funcionales y nutraceuticos para elaborar productos de la industria farmacéutica y conservación de

alimentos. La presente revisión proporciona la información más relevante publicada durante los últimos diez años (2010-2020) sobre polisacáridos bioactivos extraídos con agua caliente reportados en frutas tropicales y subproductos y su relación con posibles efectos beneficiosos para la salud.

Palabras clave: Subproductos, frutas tropicales, polisacáridos, propiedades bioactivas.

INTRODUCTION

Tropical fruits grow in tropical or subtropical climates in the geographic zone that extends from 30° south latitude up to 30° north latitude. The temperature in this area varies between 16 to 36 °C during the year (Dembitsky *et al.*, 2011). The Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, estimated in 2018 that the world production of the main tropical fruits reached around 100 million tons, with an estimated increase of 3.3 % expected by the end of 2020.

The most widely consumed tropical fruits, such as avocado (*Persea americana*), mango (*Mangifera indica*), papaya (*Carica papaya*) and pineapple (*Ananas comosus*), have reached significant commercial success. They are available practically all year in areas with temperate climates (FAO, 2018). Other fruits such as açai (*Euterpe oleraceae*), acerola (*Malpighia emarginata*), guava (*Psidium guajava*), jujube (*Ziziphus jujuba*), litchi (*Litchi chinensis*), longan (*Dimocarpus longan*), noni (*Morinda citrifolia*), passion fruit (*Passiflora edulis*) and pomegranate (*Punica granatum*), are struggling to find market sale sites since these fruits are imported from traditional producing countries. However, these fruits are increasingly in demand in international markets for their characteristic flavor, high nutrient content and variety of bioactive compounds such as phenolic acids, flavonoids, carotenoids and fiber (Enriquez-Valencia *et al.*, 2020).

Over 50% of the global volume of tropical fruit produced each year is discarded as by-product, 42% of which is comprised of peels, rind/skin and 10% of seeds (Cheek *et al.*, 2018). Most of the tropical fruits have substantial amounts of mainly polysaccharides in peel, rind/skin, seeds and pulps, which possess a varied biological activity.

Polysaccharides are polymeric carbohydrate molecules composed of long chains of monosaccharide units

*Autor para correspondencia: Leticia X. López Martínez
Correo electrónico: leticia.lopez@ciad.mx

Recibido: 1 de marzo de 2021

Aceptado: 4 de agosto de 2021

bound together by glucosidic bonds that generate various structures, with different biological properties (de Jesus Raposo *et al.*, 2015). Polysaccharides extracted from tropical fruits and sub-products have gained interest due to their numerous biological activities such as antioxidant, antifatigue, antiinflammatory, anticoagulant, hepatoprotective, immunomodulatory, antidiabetic and anticancer (Zhang *et al.*, 2016; Sousa *et al.*, 2018). This review discusses the most relevant information published in the 2010-2020 period from the main scientific databases, including Scopus, Science Direct, PubMed, Medline and Scielo, on polysaccharides and reported bioactivities of exotic tropical and their relationship with their potential beneficial effects on health.

Hot water extraction (HWE)

The extraction is a crucial process in polysaccharides isolation and production. Several methods have been applied to extract them from different plant sources, such as tropical fruits and by-products (Marić *et al.*, 2018). One of the most common methods employed is hot-water extraction (HWE), consisting on the immersion of the raw material into distilled water at high temperature, and further steps such as filtration, centrifugation, precipitation, concentration, and freeze-drying to obtain crude polysaccharides. Additionally, it has been stated that extraction factors, such as temperature, time, and solvent/material ratio, significantly affect the yield of extracted polysaccharides. HWE has been used in the extraction of polysaccharides from by-products and tropical fruits such as, açai, acerola, guava, jujube, litchi, noni, passion fruit and pomegranate (Holderness *et al.*, 2011; Joseph *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2017); the scientific names, common names and place of origin of the tropical fruits examined in this review, are shown in table 1.

Structural characteristics of tropical fruit polysaccharides and by-products

The physicochemical and structural characteristics of polysaccharides, mainly include monosaccharide composition, molecular weight, configuration, type, and position of its glycosidic bond (Liu *et al.*, 2015). Several polysaccharides

have been isolated from tropical fruits and their by-products, by a sequence of techniques such as deproteinization and ion-exchange chromatography (IEC), that separates acidic and neutral polysaccharides applying different concentrations of salts such as NaCl, as an eluent solution (Huang *et al.*, 2014).

In order to separate the different molecular weight polysaccharides, methods such as high-performance liquid chromatography (HPLC), gel permeation chromatography (GPC), high-performance gel permeation chromatography (HPGPC) and size exclusion chromatography (SEC) (Li *et al.*, 2020; Batista *et al.*, 2020), are utilized. To determine the monosaccharide composition, Holderness *et al.* (2011) and Jiao *et al.* (2018) reported de application of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), HPLC, and high-performance or anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometry detection (HPAEC/PAD). After this step, polysaccharides are subsequently collected, dialyzed, concentrated and lyophilized to produce a pure polysaccharide.

Polysaccharides with various monosaccharides, chemical structures and functional groups, are analyzed with a combination of methods such as Fourier transform infrared spectroscopy (Rong *et al.*, 2019), GC-MS (Hu *et al.*, 2020), periodate oxidation-Smith degradation and methylation analysis (Wang *et al.*, 2015; Rong *et al.*, 2019) to determine the backbone structures. Nuclear magnetic resonance (NMR) is commonly used to analyze the configurations of glycoside residues of the polysaccharides. One-dimensional (1D) proton and carbon nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H and ^{13}C NMR) have been generally employed for their structural characterization (Zhang *et al.*, 2016).

Many different polysaccharides have been isolated from seeds, rinds, pulp and peels from tropical fruits, and the structural characterization, including monosaccharide chain, ratios of the monosaccharide compositions and molecular weight, are summarized in Table 2.

Characteristics such as sugar compositions, molecular weight, sugar backbone, ratios of the monosaccharide compositions and position of the functional groups are im-

Tabla 1. Origen, nombre científico y nombre común de las frutas tropicales de esta revisión.

Table 1. Origin, scientific and common name of the tropical fruits from this review.

Name	Scientific name	Other names	Origin	Reference
Açaí	<i>Euterpe oleraceae</i>	Naidí, azaí, acaí	North of Brazil	(de Oliveira and Schwartz, 2018)
Acerola	<i>Malpighia marginata</i>	Semeruco, cerecita	Brazil	(Prakash and Baskaran <i>et al.</i> , 2018)
Guava	<i>Psidium guajava</i>		Mexico, Central and South America	(Chen <i>et al.</i> , 2015)
Jujube	<i>Ziziphus jujube</i>	Jujube	South and east Asia	(Hasan <i>et al.</i> , 2014)
Litchi	<i>Litchi chinensis</i>	Lichi, lychee, Hong Hua	Malay Peninsula	(Soni and Agrawal, 2017)
Longan	<i>Dimocarpus longan</i>	Dragon eye	China	(Lim <i>et al.</i> , 2013)
Noni	<i>Morinda citrifolia</i>	Fruta del diablo, Indian mulberry	Southeast Asia	(Carrillo-López and Yahia, 2011)
Passion fruit	<i>Passiflora edulis</i>	Pasionaria, chinola	Southern Brazil	(Lim <i>et al.</i> , 2012)
Pomegranate	<i>Punica granatum</i>		Himalayan region	(Jacob <i>et al.</i> , 2019)

Tabla 2. Caracterización de polisacáridos de las frutas tropicales en esta revisión.
Table 2. Characterization of polysaccharides from tropical fruits considered in this review.

Fruits	Part	Mono saccharide composition	Molar ratio (%)	MW KDa	Backbone structure	Other compounds	Reference
Açaí	Fruit	Fuc:Rha:Ara: Gal:Glu:Xyl: GalA:GluA	0.5:4.5:47: 11.5:2.3: 2.8:28.4:3	200	β -(1,3) -linked galactan	Protein Phenolics	(Holderness <i>et al.</i> , 2011)
Acerola ACSW	Fruit	UroA:Ara: Gal:Xyl:Rha	52.2:32.4: 7.2:4.8:3.5	75	(15) -linked α -Araf	Protein	Klosterhoff <i>et al.</i> , 2018
Bitter gourd BP1	Fruit	Rha:Ara: Xyl:Man: Glu:Gal	2.73:9.84: 3.83:5.46: 23.5:54.6	85	ND	Purified	(Li <i>et al.</i> , 2010)
BP3		Rha:Ara:Xyl: Man:Glu:Gal	2.21:8.29:3.31:11.6:19.34:55.25	100	ND	Purified	
Guava GP70-3	Fruit	Rha:GlucA: GalA:Gal: Ara	ND	ND	(15) -linked α -L-Ara (13) -linked α -L-Ara	Purified	(Jiao <i>et al.</i> , 2018)
Jujube JPC	Fruit	Man:Rib:GlucA: GalcA:- Glu:Xyl: Gal:Ara:UroA	5.3:3.1:3.6: 11.4:13.4:14.5:23.4: 25.1:25	ND	ND	Protein	(Chi <i>et al.</i> , 2015)
Litchi	Pulp	Rha:Ara:Xyl: Man:Glu:Gal	0.31:5.44: 71:2.2:66.1:11.5	970	ND	Protein Phenolics	(Huang <i>et al.</i> , 2017)
	Seeds	Ara:Man:Glu: Gal	6.33:3.88: 10.4:1.1	6.70	1,4- α -Glc _p and 1,4- β -Man _p	Purified	(Wu <i>et al.</i> , 2020)
Longan LPD2	Pulp	Ara:Man:Glu: Gal	0.25:0.49:1: 0.5	9640	(14)- β -Glc and (16)- β -Man	Acetyl groups	(Rong <i>et al.</i> , 2019)
Noni	Juice	GalA:Gal:Ara: Rha:Man	29.1:30.9: 31:5.4:3.6	ND	ND	Acetyl groups	(Sousa <i>et al.</i> , 2018)
Pomen granate PSP001	Rind	ND	ND	110	β -1-3 galactop	ND	(Joseph <i>et al.</i> , 2012)

ND: Not determined; MW: Molecular weight; KDa: Kilodaltons.

Fuc: Fucose, GalA: galacturonic acid, Gal: galactose, Glu: glucose, Ara: arabinose, Ram: rhamnose; Man: mannose, Xyl: Xylose, UroA: Uronic acid, *p*:pyranose.

portant for their biological activities (Sousa *et al.*, 2018; Rong *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2020). It is essential to know that the natural polysaccharides in tropical fruits and by-products are not always isolated, but are conjugated with other structures such as phenolic compounds, amino acids, and proteins (Holderness *et al.*, 2011; Klosterhoff *et al.*, 2018) and sometimes, these conjugates of polysaccharides act as a whole in isolation, which affects their biological activities.

Biological activities of fruit polysaccharides

In recent years, polysaccharides from tropical fruits have been extensively studied for biological activities, such as antioxidant, antidiabetic, antiinflammatory, immunomodulatory, hepatoprotective, anticancer and antifatigue effects.

Antioxidant activity. Oxidative stress, generated mainly by an imbalance between the formation and removal of free radicals by the antioxidant defense, is the cause of most human ailments (Bhattacharya, 2015). The structural characteristics of polysaccharides will determine their

antioxidant action mechanism, as well as the method to be used for their evaluation. In this sense, Zhang *et al.* (2016) isolated two water-soluble polysaccharides (P90 and GP90) from guava pulp, and at a concentration of 0.4 mg/mL, the GP90 scavenging activity to inhibit DPPH radical was higher (97.3 %) than P90 (12.8 %), and the EC₅₀ value was reported at 0.0672 and 1.621 mg/mL, respectively. The differences in their antioxidant activity may be related to the presence of a protein conjugated to P90. It has been shown that in some occasions, the functional groups present in proteins are less sensitive to antioxidant assays (Wang *et al.*, 2012). Litchi pulp polysaccharides have also shown a DPPH scavenging activity of 34.6 % at 5 mg/mL (Gao *et al.*, 2017). On the other hand, Li *et al.* (2020) reported that noni polysaccharides demonstrate a concentration-dependent scavenging ability of ABTS radical, ranging from 10-75 % at concentrations of 0.2-5.0 mg/mL with an EC₅₀ of 3.0 mg/mL. de Sousa Sabino *et al.* (2020) isolated water-soluble polysaccharides from by-products of different tropical fruits and evaluated their ABTS scavenging activity at a concentration of 0.05 mg/mL. The result showed

that acerola polysaccharide presented the highest scavenging activity, decreasing in a 59 % the ABTS radical, followed by polysaccharides from pineapple (55 %), passion fruit (34 %), and mango polysaccharide with the lowest scavenging capacity (10 %) at the same concentration.

The *in vivo* antioxidant effects of polysaccharides from tropical fruits and by-products were also investigated. Chi *et al.* (2015) reported that oral administration of polysaccharide conjugates from jujube (200 mg/kg) in rats, increased the activities of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) to 20.4 and 17.2 %, whereas the level of malondialdehyde (MDA) decrease 31.4 %. In a different study, Sousa *et al.* (2018) reported that polysaccharide extracted from noni (10 mg/kg) stimulates glutathione-S-transferase about two-fold and decrease malondialdehyde levels about 8.2-fold in rats with carrageenan-induced paw edema.

Immunomodulatory activity. It has been demonstrated that immunomodulatory polysaccharides can interact with the immune system, leading to the activation and triggering of several molecular and cellular events or suppressing the activity of lymphoid cells (Minzanova *et al.*, 2018; Yin *et al.*, 2019). In this sense, different studies have reported *in vivo* and *in vitro* immunomodulatory activities of polysaccharides from tropical fruits and by-products. Rong *et al.* (2019) isolated a polysaccharide (LPD2) from longan pulp. They observed that the treatment with 50 μ L of LPD2 at concentration of 100 μ g/mL, increased the splenic lymphocytes by 250 % and the macrophage phagocytosis by 205.1 % to the control value. In other studies, longan pulp polysaccharides were evaluated at 100 and 200 mg/kg, both treatments showing potent immunomodulatory properties in mice models, including enhanced DTH response, macrophage phagocytosis and ConA-stimulated splenocyte proliferation (Zhong *et al.*, 2010). Polysaccharide (LCP50W) isolated from litchi pulp exhibited *in vivo* immunomodulatory activity, enhancing Natural Killers (NK) cells cytotoxicity and promoting mouse splenocytes proliferation (Huang *et al.*, 2014).

Furthermore, LCP50W enhanced Th1 cytokine IFN- γ secretion, reduced Th2 cytokine IL-4 secretion, and improved T-bet expression while inhibiting the GATA-3 gene expression. In addition, LCP50W promoted the cell cycle toward the S phase (Jing *et al.*, 2014). Three polysaccharides fractions (GSF1, GSF2 and GSF3) were isolated from guava seeds, and administered to mouse splenocytes and peritoneal macrophages to confirm the activity, based on changes in Th1/Th2 and pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines secretion, respectively. All fractions, particularly GSF3, were found to have a Th2-inclination activity and anti-inflammatory capacity (Lin and Lin, 2020). Polysaccharides induced robust $\gamma\delta$ T cell stimulatory activity in human, mouse, and bovine PBMC cultures. Also, it was found that açai polysaccharides were active by promoting myeloid and $\gamma\delta$ T cells activation, and when polysaccharides were delivered *in vivo* in mice, they induced myeloid cell recruitment and IL-12 production (Holderness *et al.*, 2011).

Modulation of blood glucose. Modulation of blood glucose properties of the polysaccharides is mediated different ways including inhibiting α -amylase and α -glucosidase activities, improving cell dysfunction, targeting signaling pathways to improve glucose metabolism and enhance insulin action (Yuan *et al.*, 2019).

The α -glucosidase can hydrolyze α -1,4-glycosidic bonds from non-reducing ends of polysaccharides to release glucose. The released glucose is absorbed by the small intestine into the blood, increasing the blood glucose level and aggravating type II diabetes; therefore, the inhibition of this enzyme is important to regulate blood glucose.

Several studies have reported the inhibition of this enzyme *in vitro* by polysaccharides of tropical fruits and by-products. For example, Zhang *et al.* (2016) described that the water-soluble polysaccharide (GP-90) isolated from guava pulp showed α -glucosidase inhibition with IC_{50} value = 2.27 μ g/mL, this value was 1379 times higher than the positive control acarbose (IC_{50} = 3.13 mg/mL). Similar findings have been reported by Jiao *et al.* (2018) in the polysaccharide (GP70-3) from guava fruit also exhibited an important α -glucosidase inhibitory activity *in vitro* (IC_{50} = 2.54 μ M), which was 1867 times higher than acarbose (IC_{50} = 4.74 mM). Also, an isolated polysaccharide from litchi seeds (LSP-W-4) exhibited inhibitory activity against mammalian (rat-intestinal acetone powder) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) α -glucosidase, with IC_{50} values of 66.97 and 75.24 μ M, respectively (Wu *et al.*, 2020). Moreover, the oral administration of 200 mg/kg lychee polysaccharide suspension showed a glucose-lowering effect decreasing from 29.3 to 23 mM/L after 30 min administration to alloxan-induced diabetic rats (Huang *et al.*, 2017).

Polysaccharides derived from jujube (ZSP) at 0, 200 or 400 mg/kg were administrated intragastrically to fructose treated mice with (20 % high-fructose water), which had impaired insulin sensitivity, hyperglycemia and hyperinsulinemia. Administration of ZSP at 400 mg/kg reduced the levels of glucose in serum from 9.62 to 8.42 mM/L, insulin concentrations were lowered markedly from 72.73 to 44.61 pmol/L, the homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) score of the mice treated with 200 or 400 mg/kg displayed a reduction of 25.3 and 31.3 %, compared to the control group. Also, the β -cell function values (HOMA- β) were reduced by 10.6 and 20.0 %, at 200 and 400 mg/kg, respectively (Zhao *et al.*, 2014).

The studies reported above indicated that polysaccharides from tropical fruits and by-products showed the capacity to modulate glucose on blood.

Anticancer activity. Polysaccharides isolated from fruit sources have been described to act on cancerous cells, primarily via apoptosis induction. Polysaccharides from tropical fruits act through DNA damage, disruption of mitochondrial membrane, cell cycle arrest and nitric oxide production, to kill cancer cells and prevent metastasis (Khan *et al.*, 2020).

The antiproliferation impact of jujube polysaccharides on melanoma cells indicated a dose and time-dependent behavior. The IC_{50} value was 3.90 mg/mL after 24 h of treatment,

and reduced to 3.36 mg/mL after 48 h. The cell cycle assay showed that polysaccharides decreased cyclin B expression, causing the arrest of melanoma cells in the G2/M phase (Hung *et al.*, 2012). In another study, Huang *et al.* (2014) showed the inhibitory effect of polysaccharides from litchi pulp on the proliferation of human liver (HepG2) and human cervical (Hela) cancer cells, of 41.4 and 26.7 %, at 750 µg/mL, respectively, while the growth of human lung epithelial (A549) cancer cells decreased 27.2 % at 450 µg/mL.

Polysaccharide (PSP001) isolated from pomegranate was evaluated on KB (nasopharyngeal carcinoma), K562 (leukemia) and MCF-7 (breast cancer) cells, as an antineoplastic agent. The effects were observed at 72 h of incubation for K562 cells and MCF-7 at a concentration of 0.001 µg/mL, with IC_{50} values of 52.8 and 97.21 µg/mL. PSP001 showed its best cytotoxicity at 200 µg/mL against KB and MCF-7 cell lines, while in K562 cell line was at 1000 µg/mL (Joseph *et al.*, 2012). Additionally, polysaccharides from passion fruit (PFCM) dissolved in water, were administered to mice transplanted with the Sarcoma 180 tumor into the left hind groin. A tumoral growth inhibition was observed. The oral administration of PFCM at 50 and 100 mg/kg inhibited the tumor growth by 40.5 and 48.7 %, respectively. The intraperitoneal administration (10 and 25 mg/kg) led to tumor inhibition of 70.4 and 72.89 %, respectively. The author concluded that inhibition is associated with the proportion of extensive coagulative necrosis of the tumors extirpated from treated mice (Silva *et al.*, 2012).

Antiinflammatory activities. Inflammation is a complex biological reaction of vascular tissue to detrimental stimuli, such as pathogens, damaged cells or irritants, that consists of both vascular and cellular responses (Yan-Hang and Ke-Wu, 2019). The continuous presence of inflammatory mediators such as interleukin 1-beta (1L-β) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) can upregulate nitric oxide production and prostaglandin E2. Also, enhancing the activity, cyclooxygenase-2 (COX-2), the stimulation of inducible NO synthase (iNOS) and microsomal PGE synthase-1 (mPGES-1) expression in target cells, play a critical role in developing various significant pathologies, including colitis, atherosclerosis, chronic fatigue syndrome, cardiovascular disorders, neurodegenerative diseases, and some types of cancer (Chi *et al.*, 2015).

Some studies have supported the anti-inflammatory activities of the polysaccharides from tropical fruits. PFPe, a polysaccharide from passion fruit, was applied on carrageenan-induced rat paw edema. Carrageenan (50 µg/paw) provoked edema that reached a maximum level after 3 h. Intraperitoneal treatment with PFPe at doses of 0.3, 1.0 or 3.0 mg/kg, resulted in a reduction of paw edema formation at 3 h of 34.2, 39.5 and 60.6%, respectively. However, only the treatment at 3 mg/kg could decrease the inflammatory response caused by histamine (85.3 % reduction), serotonin (5-HT) (58 % reduction), or PGE2 (62.2 % reduction). The results indicate that PFPe administration decreases the inflammatory response by modulating the release or synthesis of serotonin and histamine by reducing neutrophil migration (Silva *et al.*, 2015).

Yue *et al.* (2015) described that wild jujube polysaccharides (WJPS) alleviated inflammatory bowel disease, in mice with colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). WJPS significantly decreased the severity of colitis and improved the mucosal damage in mice. Treatment with WJPS decreased the inflammatory reaction by attenuation of IL-6, IL-1β, and TNF-α stimuli tests.

Batista *et al.* (2020) showed that polysaccharides from noni (PLS) exhibited significant anti-inflammatory activity in a rat model using acetic acid-induced colitis. Administration of PLS at 3 mg/kg, reduced IL-1β and TNF-α levels in the colon (1.61 and 2.90 pg/mL) compared to the colitis group (3.58 and 4.71 pg/mL), respectively. Also, it inhibited the colon expression of COX-2 (0.32 COX-2/p38) compared to the colitis group (0.66 COX-2/p38). The author implies that PLS shows anti-inflammatory capacity against intestinal injury by reducing the pro-inflammatory action of cytokines, COX-2 expression and inflammatory cell infiltration in the inflamed colon.

Antifatigue effects. Fatigue is a defensive system in response to life-threatening, over exhaustion and often leads to muscle soreness, anxiety and depression. If persistent fatigue is not eliminated, it may lead to different pathologies such as aging hypertension (Zheng *et al.*, 2010). The search for natural compounds that delay fatigue or accelerate its elimination in human beings with few side effects is continuous (Xu *et al.*, 2013), then the study of polysaccharides is a field that is beginning. For example, Zheng *et al.* (2010) studied the effect of antifatigue activity from hot-water longan seed polysaccharides, administered orally to ICR male mice using a swimming test, including hepatic, serum urea nitrogen and blood lactic acid content evaluation. The results show that the polysaccharides in doses ranging from 50, 100, 150 and 200 mg/kg, extended swimming time from the control (650 s) to 1100, 800, 1250 and 900 s, respectively, increased hepatic glycogen in all mice except at 50 mg/kg, compared with the control. All dosages decreased blood urea nitrogen and blood lactic acid but only at doses of 50 and 100 mg/kg.

Other studies reported the effect of the oral administration of arabinan-rich pectin from acerola fruit (ACSW) for 28 days at doses of 50, 100 and 200 mg/kg, could lengthen the swimming time, which showed a longer time to exhaustion (95, 151 and 129 min, respectively), related to the control (53 min). Furthermore, the mitochondrial respiratory capacity of the skeletal muscle, was enhanced at 200 mg/kg (Klosterhoff *et al.*, 2018).

Hepatoprotective activity. The administration of polysaccharides from acerola (ACP) at 200, 400 and 800 mg/kg to mice fed with high-fat diets (HFD), reduces the content of total triglycerides in the liver (16.1, 17.9 and 44.2 %, respectively) and attenuation of hepatic steatosis. ACPs markedly ameliorated hepatic lesions produced by HFD feeding, showing near-normal appearance with a well-preserved cytoplasm. The authors conclude that hepatic damage decreased by

inhibition of the sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c) pathway in mice (Hu *et al.*, 2020).

The hepatoprotective effect of polysaccharides from guava (PG) was investigated against paracetamol-induced liver damage in rat models. The results showed that the PG administration at 200 and 400 mg/kg in the paracetamol group reverted to normal the high levels of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase (Alias *et al.*, 2015). Thus, tropical fruit polysaccharides can be considered potential auxiliary foods to protect the liver from drugs or diet-related injuries.

Gastroprotective effects. Studies on tropical fruit and by-products about the gastroprotective effect of polysaccharides extracted is scarce. In this sense, rats with ethanol-induced gastrointestinal damage were orally fed with polysaccharides from acerola (1 mg/kg). The results revealed that these polysaccharides maintained GSH levels in the gastric mucosa. GSH is a molecule that shows an essential role in maintaining mucosal integrity as one of the main water-soluble antioxidants. GSH may decrease or even be depleted, due to the presence of oxidizing agents such as ethanol that stimulate an increase of free radicals in gastric tissue (de Sousa Sabino *et al.*, 2020).

CORRELATION OF STRUCTURE AND BIOLOGICAL ACTIVITY

The biological activities of polysaccharides from tropical fruits and by-products seem to be associated with their molecular weight and chemical structures. The presence of functional groups, including sulfate or acetyl, amino acids and proteins in their chemical structures, can influence the bioactivity by affecting their charge and solubility. However, studies that establish the precise relationship of structure and biological activities in polysaccharides from tropical fruits and by-products are limited; thus, more studies that establish those relationships are necessary.

It is recognized that the polysaccharides molecular weight is directly associated with some biological activities (Wang *et al.*, 2012; de Sousa Sabino *et al.*, 2020), e.g., in the case of antioxidant activity, Li *et al.* (2020) described that high molecular weight polysaccharides displayed higher antioxidant activities, due to the high molecular weight allowed the spatial conformation of the polysaccharides to be maintained. However, Wang *et al.* (2016) reported that the lowest molecular weight polysaccharides showed the highest antioxidant activity, since they could include more reducing hydroxyl groups in order to scavenge free radicals. On the other hand, the uronic acid content is considered another important indicator reflecting the polysaccharides antioxidant activity. Li *et al.* (2020) reported that polysaccharides rich in uronic acids have higher antioxidant activities, due to the uronic acid capacity to alter the physicochemical properties and solubility of the associated polysaccharide conjugates, and therefore affect their antioxidant activities (Wang *et al.*, 2011). Other studies show that the antioxidant activities of the sulfated and acetylated derivatives are more potent than that of pure polysaccharides (Khan *et al.*, 2020).

It has been suggested that the interaction between polysaccharides and α -glucosidase is affected by the molecular weight. Low molecular weight polysaccharides exhibited a higher inhibition capacity (Dou *et al.*, 2015). Related to the type of inhibition, polysaccharides containing sulphate produced a mixed inhibition while the desulphated generated non-competitive inhibition (Qian *et al.*, 2015). However, Dou *et al.* (2015) reported a mixed inhibition in non-sulphated polysaccharides. For anticancer activities, the presence of β -(13) linkages in the main chain of the polysaccharide are important since allow an increase in immunocompetent cells activities (Wasser, 2002). Various chemical structures have been reported for the antitumor polysaccharides in different studies, including a backbone composed of (15)-linked-Araf (Jiao *et al.*, 2018). Also, other authors reported that low molecular weight polysaccharides exhibited stronger antiproliferative activities (Hung *et al.*, 2012).

Polysaccharides containing sulphate groups, possess strong immunomodulatory capacity, which notably reduces when the polysaccharides are desulphated (Yi *et al.*, 2012). Nevertheless, other authors reported that low molecular weight polysaccharides exhibited stronger immunomodulatory activity, and that the polysaccharides molecular weight might play a more critical role than sulphate content, because low molecular weight might increase the capacity of polysaccharides to identify and bind immune complexes (Yi *et al.*, 2012). Other investigations reported that the acetyl groups played a crucial role in maintaining the high immunoregulatory activity of polysaccharides since promotes the formation of hydrophobic pockets in polysaccharides, triggering different immunostimulatory responses (Ferreira *et al.*, 2015).

For the above mentioned, it is necessary to carry out more in-depth studies to characterize polysaccharides of tropical fruits and their by-products, and the relationship of their structure with different biological activities.

CONCLUSION

Tropical fruits and their by-products are an excellent source of bioactive compounds, including polysaccharides that have shown antioxidant, immunomodulatory, anti-inflammatory, among other activities, so their application to promote beneficial health effects are promising. Therefore, polysaccharides are an alternative for new functional foods. The by-product production of these fruits is extremely high, and the seeds and skins have proven to be an important source of bioactive compounds. The preparation of new polysaccharide-based alcoholic and non-alcoholic beverages, and their use in the preparation of bakery products and pasta, can contribute to human health benefits. These benefits could improve the demand, distribution, and marketing of these tropical fruits. Therefore, it is necessary to develop additional work on the bioactivities of the polysaccharides from tropical fruits and their by-products to generate more information that allows us to develop functional foods, regarding the stability of their bioactive compounds and the benefits of their consumption.

REFERENCES

- Alias, A., Othman, F., Li, A.R., Kamaruddin, A., Yusof, R. y Hussan, F. 2015. Supplementation of *Psidium guajava* (Guava) fruit polysaccharide attenuates paracetamol-induced liver injury by enhancing the endogenous antioxidant activity. *Sains Malaysiana*. 44: 1129-1136.
- Bhattacharya, Susinjan. Reactive oxygen species and cellular defense system. En: *Free radicals in human health and disease*. Rani V. y Yadav U.C.S. (ed.), pp 17-29. New Delhi: Springer, India
- Batista, J.A., de Aguiar Magalhães, D., Sousa, S.G., dos Santos Ferreira, J., Pereira, C.M.C., do Nascimento Lima, J.V., Figueira de Albuquerque, I., Sousa Dutra Bezerra, N.L. Vieira de Brito, T., da Silva Monteiro, C.E., Franco, A.X., Di Lenardo, D., Almeida Oliveira L., J.P., de Andrade Feitosa, Monteiro de Paula, R.C., Nogueira Barros, F.C., Soares de Oliveira, J., Pereira Vasconcelos, D.F., Gomes Soares, P.M.y dos Reis Barbosa, A.L. 2020. Polysaccharides derived from *Morinda citrifolia* Linn reduce inflammatory markers during experimental colitis. *Journal of Ethnopharmacology*. 248: 112303.
- Carrillo-López, A. y Yahia, E.M. 2011. Noni (*Morinda citrifolia* L.). En: *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*. Editor(s): Elhadi M. Yahia (ed.), pp 51-64e. Woodhead Publishing.
- Chen, Y., Zhou, T., Zhang, Y., Zou, Z., Wang, F. y Xu, D. 2015. Evaluation of antioxidant and anticancer activities of guava. *International Journal of Food Nutrition and Safety*. 6: 1-9.
- Cheok, C.Y., Mohd Adzahan, N., Abdul Rahman, R., Zainal Abedin, N.H., Hussain, N., Sulaiman, R. y Chong, G.H. 2018. Current trends of tropical fruit waste utilization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 58: 335-361.
- Chi, A., Kang, C., Zhang, Y., Tang, L., Guo, H., Li, H. y Zhang, K. 2015. Immunomodulating and antioxidant effects of polysaccharide conjugates from the fruits of *Zizyphus Jujube* on Chronic Fatigue Syndrome rats. *Carbohydrate Polymers*. 122: 189-196.
- de Sousa Sabino, L.B., da Costa Gonzaga, M.L., de Siqueira Oliveira, L., Duarte, A.S. G., e Silva, L.M.A., de Brito, E.S., de Figueiredo, W., da Silva, M.R.L. y de Sousa, P.H.M. 2020. Polysaccharides from acerola, cashew apple, pineapple, mango, and passion fruit co-products: Structure, cytotoxicity and gastroprotective effects. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 24: 100228.
- de Jesus Raposo, M.F., De Morais, A.M.B. y De Morais, R.M.S.C. 2015. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Marine Drugs*. 13: 2967-3028.
- Dembitsky, V.M., Poovarodom, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Vearasilp, S., Trakhtenberg, S. y Gorinstein, S. 2011. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. *Food Research International*. 44: 1671-1701.
- Dou, Z., Chen, C. y Fu, X. 2019. The effect of ultrasound irradiation on the physicochemical properties and α -glucosidase inhibitory effect of blackberry fruit polysaccharide. *Food Hydrocolloids*. 96: 568-576.
- Enriquez-Valencia, S.A., Julieta Salazar-Lopez, N.J, Robles-Sanchez, M., Gonzalez-Aguilar, G.A., Fernando Ayala-Zavala, J. y Lopez-Martinez, L.X. 2020. Bioactive properties of exotic tropical fruits and their health benefits. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 70:205-214.
- FAO. El futuro de la alimentación y la agricultura: Vías alternativas hacia el 2050. Versión resumida. [Consultado enero 2021] 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/3/CA1553ES/ca1553es.pdf>
- Ferreira, S.S., Passos, C.P., Madureira, P., Vilanova, M. y Coimbra, M.A. 2015. Structure–function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*. 132: 378-396.
- Gao, W., Lin, P., Zeng, X.A. y Brennan, M.A. 2017. Preparation, characterization and antioxidant activities of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) polysaccharides extracted by ultra-high pressure. *International Journal of Food Science & Technology*, 52: 1739-1750.
- Hasan, N.M., Al Sorkhy, M.A., Al Battah, F.F. 2014. *Ziziphus jujube* (ennab) of the middle east, food and medicine. *Unique Journal of Ayurvedic Herbal Medicine*. 2: 7-14.
- Holderness, J., Schepetkin, I.A., Freedman, B., Kirpotina, L.N., Quinn, M.T., Hedges, J.F. y Jutila, M.A. 2011. Polysaccharides isolated from Açai fruit induce innate immune responses. *PLoS one*. 6: e17301.
- Hu, Y., Yin, F., Liu, Z., Xie, H., Xu, Y., Zhou, D. y Zhu, B. 2020. Acerola polysaccharides ameliorate high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease through reduction of lipogenesis and improvement of mitochondrial functions in mice. *Food and Function*. 11: 1037-1048.
- Huang, L.L., Qiao, F., Peng, G., Yang, X.T. y Duan, X. 2017. Effect of two drying methods on antioxidant activity and hypoglycemic action of polysaccharides in three cultivars of lychee pulp. *Drying Technology*. 35: 1994-2001.
- Huang, F., Zhang, R., Yi, Y., Tang, X., Zhang, M., Su, D., Deng, Y. y Wei, Z. 2014. Comparison of physicochemical properties and immunomodulatory activity of polysaccharides from fresh and dried litchi pulp. *Molecules*. 19: 3909-3925.
- Hung, C.F., Hsu, B.Y., Chang, S.C. yand Chen, B.H. 2012. Antiproliferation of melanoma cells by polysaccharide isolated from *Zizyphus jujuba*. *Nutrition*. 28: 98-105.
- Jacob, J., Rajiv, P., Gopalan, R. y Lakshmanaperumalsamy, P. 2019. An Overview of Phytochemical and pharmacological potentials of *Punica granatum* L. *Pharmacognosy Journal*. 11.
- Jiao, Y., Hua, D., Huang, D., Zhang, Q. y Yan, C. 2018. Characterization of a new heteropolysaccharide from green guava and its application as an α -glucosidase inhibitor for the treatment of type II diabetes. *Food and Function*. 9: 3997-4007.
- Jing, Y., Huang, L., Lv, W., Tong, H., Song, L., Hu, X. y Yu, R. 2014. Structural characterization of a novel polysaccharide from pulp tissues of *Litchi chinensis* and its immunomodulatory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62: 902-911.
- Joseph, M.M., Aravind, S.R., Varghese, S., Mini, S. y Sreelekha, T.T. 2012. Evaluation of antioxidant, antitumor and immunomodulatory properties of polysaccharide isolated from fruit rind of *Punica granatum*. *Molecular Medicine Reports*. 5: 489-496.
- Khan, T., Ali, M., Khan, A., Nisar, P., Jan, S.A., Afridi, S. y Shinwari, Z.K. 2020. Anticancer plants: A review of the active phytochemicals, applications in animal models, and regulatory aspects. *Biomolecules*. 10: 47.
- Klosterhoff, R.R., Kanazawa, L. K., Furlanetto, A. L., Peixoto, J.V., Corso, C.R., Adami, E.R., Iacomini, M., Rosalvo, T.H., Fogaça, A.A., Cadena Silva, M.S.C., Andreatini, R. y Cordeiro, L. M. 2018. Antifatigue activity of an arabinan-rich pectin from acerola (*Malpighia emarginata*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 109: 1147-1153.
- Li, J., Niu, D., Zhang, Y. y Zeng, X.A. 2020. Physicochemical properties, antioxidant and antiproliferative activities of polysaccharides from *Morinda citrifolia* L. (Noni) based

- on different extraction methods. *International Journal of Biological Macromolecules*. 150: 114-121.
- Li, J., Wang, Y., Huang, J., Xu, X. y Xiang, C. 2010. Characterization of antioxidant polysaccharides in bitter melon (*Momordica charantia* L.) cultivars. *Journal of Food Agriculture and Environment*. 8: 117-120.
- Lim, T.K. 2012. *Passiflora edulis*. En: *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. pp 147-165. Springer, Dordrecht.
- Lin, H.C. y Lin, J.Y. 2020. Characterization of guava (*Psidium guajava* Linn) seed polysaccharides with an immunomodulatory activity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 154: 511-520.
- Liu, X., Luo, Y., Zha, C., Zhou, S., Liu, L. y and Zhao, L. 2015. Rheological properties of polysaccharides from longan (*Dimocarpus longan* Lour) fruit. *International Journal of Polymer Science*, 2015.
- Marić, M., Grassino, A.N., Zhu, Z., Barba, F.J., Brnčić, M. y Brnčić, S.R. 2018. An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound, microwaves, and enzyme-assisted extraction. *Trends in Food Science and Technology*. 76: 28-37.
- Minzanova, S.T., Mironov, V.F., Arkhipova, D.M., Khabibullina, A.V., Mironova, L.G., Zakirova, Y.M. y Milyukov, V.A. 2018. Biological activity and pharmacological application of pectic polysaccharides: A review. *Polymers*. 10: 1407.
- de Oliveira, M.D.S. y Schwartz, G. 2018. Açai—*Euterpe oleracea*. En *Exotic Fruits Reference Guide*. Rodrigues, S., Silva, E., de Brito, E. (ed.), pp. 1-5. Academic Press, Cambridge, UK.
- Prakash, A. y Baskaran, R. 2018. Acerola, an untapped functional superfruit: a review on latest frontiers. *Journal of Food Science and Technology*. 55: 3373-3384.
- Qian, J. Y., Bai, Y. Y., Tang, J. y Chen, W. 2015. Antioxidation and α -glucosidase inhibitory activities of barley polysaccharides modified with sulfation. *LWT-Food Science and Technology*. 64: 104-111.
- Rong, Y., Yang, R., Yang, Y., Wen, Y., Liu, S., Li, C., Hu, Z., Cheng, X. y Li, W. 2019. Structural characterization of an active polysaccharide of longan and evaluation of immunological activity. *Carbohydrate Polymers*. 213: 247-256.
- Silva, D.C., Freitas, A.L.P., Barros, F.C.N., Lins, K.O., Alves, A.P.N., Alencar, N. M., de Figueiredo, I.S.T., Pessoa, C., de Moraes, M.O., Costa-Lotufo, V., Judith P.A., Maciel, J.S, de Paula y de Paula, R.C. 2012. Polysaccharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties. *Carbohydrate Polymers*. 87: 139-145.
- Silva, R.O., Damasceno, S.R., Brito, T.V., Dias, J.M., Fontenele, A.M., Braúna, I.S., Júnior, J.S.C., Maciel, J.S., de Paula, R.C.M., Ribeiro, R., Souza, M.H.L.P., Freitas, A.L., Medeiros, J-V.R., Silva, D.C. y Barbosa, A.L. 2015. Polysaccharide fraction isolated from *Passiflora edulis* inhibits the inflammatory response and the oxidative stress in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 67: 1017-1027.
- Soni, R. y Agrawal, S. 2017. *Litchi chinensis*: taxonomy, botany and its cultivars. En *Lychee Disease Management*. M. Kumar, V. Kumar, N. Bhalla-Sarin, A. Varma (eds) pp. 191-215. Springer, Singapore.
- Sousa, S.G., Oliveira, L.A., de Aguiar Magalhães, D., de Brito, T.V., Batista, J.A., Pereira, C.M.C., de Souza Costa, M., Raposo Mazulo, J.C., de Carvalho Filgueiras, M., Pereira Vasconcelos D.F., Alves da Silva, D., Nogueira Barros, F.C., Sombra, V.G., Ponte, A. y dos Reis Barbosa, A.L. 2018. Chemical structure and anti-inflammatory effect of polysaccharide extracted from *Morinda citrifolia* Linn (Noni). *Carbohydrate Polymers*. 197: 515-523.
- Wang, Y., Yang, Z. y Wei, X. 2012. Antioxidant activities potential of tea polysaccharide fractions obtained by ultra-filtration. *International Journal of Biological Macromolecules*. 50: 558-564.
- Wang, J., Hu, S., Nie, S., Yu, Q. y Xie, M. 2016. Reviews on mechanisms of *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
- Wasser S.P. 2020. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60: 258-274.
- Wu, J., Xu, Y., Liu, X., Chen, M., Zhu, B., Wang, H., Shi, S., Qin, L. y Wang, S. 2020. Isolation and structural characterization of a non-competitive α -glucosidase inhibitory polysaccharide from the seeds of *Litchi chinensis* Sonn. *International Journal of Biological Macromolecules*. 154: 1105-1115.
- Yi, Y., Zhang, M. W., Liao, S. T., Zhang, R.F., Deng, Y.Y., Wei, Z.C., Tang, X.J., y Zhang, Y. 2012. Structural features and immunomodulatory activities of polysaccharides of longan pulp. *Carbohydrate Polymers*. 87: 636-643. Yan-Hang, W. y Ke-Wu, Z. 2019. Natural products as a crucial source of anti-inflammatory drugs: recent trends and advancements. *Traditional Medicine Research*. 4:257.
- Yin, M., Zhang, Y. y Li, H. 2019. Advances in research on immunoregulation of macrophages by plant polysaccharides. *Frontiers in Immunology*. 10: 145.
- Yuan, Q., Fu, Y., Xiang, P.Y., Zhao, L., Wang, S.P., Zhang, Q., Liu, Y-T., Qin, W., Li, D-Q. y Wu, D.T. 2019. Structural characterization, antioxidant activity, and antiglycation activity of polysaccharides from different chrysanthemum teas. *Royal Society of Chemistry Advances*. 9: 35443-35451.
- Yue, Y., Wu, S., Li, Z., Li, J., Li, X., Xiang, J. y Ding, H. 2015. Wild jujube polysaccharides protect against experimental inflammatory bowel disease by enabling enhanced intestinal barrier function. *Food and Function*. 6: 2568-2577.
- Xu, C., Lv, J., Lo, Y. M., Cui, S. W., Hu, X. y Fan, M. 2013. Effects of oat β -glucan on endurance exercise and its antifatigue properties in trained rats. *Carbohydrate Polymers*. 92: 1159-1165.
- Zhang, Z., Kong, F., Ni, H., Mo, Z., Wan, J.B., Hua, D. y Yan, C. 2016. Structural characterization, α -glucosidase inhibitory and DPPH scavenging activities of polysaccharides from guava. *Carbohydrate Polymers*. 144: 106-114.
- Zhao, Y., Yang, X., Ren, D., Wang, D. y Xuan, Y. 2014. Preventive effects of jujube polysaccharides on fructose-induced insulin resistance and dyslipidemia in mice. *Food and Function*. 5: 1771-1778.
- Zheng, S.Q., Jiang, F., Gao, H.Y. y Zheng, J.G. 2010. Preliminary observations on the antifatigue effects of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed polysaccharides. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 24: 622-624.
- Zhong, K., Wang, Q., He, Y. y He, X. 2010. Evaluation of radicals scavenging immunity-modulatory and antitumor activities of longan polysaccharides with ultrasonic extraction on in S180 tumor mice models. *International Journal of Biological Macromolecules*. 47: 356-360.



Recubrimiento comestible a base de alginato en combinación con eugenol nanoencapsulado y su efecto conservador en la vida útil de jitomate (*Solanum lycopersicum*)

Alginate-based edible coating in combination with nanoencapsulated eugenol and its preservative effect on the shelf life of tomato (*Solanum lycopersicum*)

Andrés Mauricio Piña-Barrera¹, Marbella Sarai Ramírez Pérez², Rocío Álvarez Román³, Juan Gabriel Báez González², Carlos Abel Amaya Guerra², Sergio Arturo Galindo Rodríguez^{2*}

¹ Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Morelos, Morelos, 67515, Nuevo León, México.

² Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, 66450, Nuevo León, México.

³ Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, 64460, Nuevo León, México.

RESUMEN

Las deficiencias en la tecnología postcosecha y el ataque de fitopatógenos ocasionan que los productos hortofrutícolas, como el jitomate, presenten una vida útil muy corta. Además del daño económico, esto puede traer efectos negativos sobre la salud y el medio ambiente. El objetivo de este trabajo fue evaluar un recubrimiento activo de alginato de sodio en combinación con nanocápsulas poliméricas cargadas con eugenol (AL-NP-EUG) para mejorar la vida útil del jitomate. Utilizando la técnica de nanoprecipitación se obtuvieron NP con un tamaño de 171 nm, un índice de polidispersidad de 0.113 y un potencial zeta de -2.47 mV. Utilizando la técnica de *HS-SPME* con CG-FID, se determinó un porcentaje de eficiencia de encapsulación de 31.85 % para el EUG. El estudio de vida útil demostró que los jitomates tratados con el AL-NP-EUG mantuvieron por más tiempo la firmeza que aquellos sin el recubrimiento. Además, en el ensayo de patogenicidad se demostró que los jitomates con el AL-NP-EUG no presentaron signos de daño ocasionado por el fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporoides*. Se concluyó que la formulación de EUG nanoencapsulado e incorporado al recubrimiento comestible presenta alto potencial para su aplicación como nanoconservador natural de productos hortofrutícolas como el jitomate.

Palabras clave: Vida útil, recubrimientos comestibles, eugenol, nanopartículas poliméricas y *HS-SPME*.

ABSTRACT

Deficiencies in post-harvest technology and the attack of phytopathogens cause a very short shelf life of fruits and vegetables, such as tomatoes. In addition to the economic damage, it can have negative effects on health and the environment. The objective of this work was to apply an active sodium alginate coating in combination with eugenol-loaded polymeric nanocapsules (AL-NP-EUG) to improve the shelf life of tomato. Using the nanoprecipitation technique, NP were obtained with a mean size of 171 nm, a polydispersity index of 0.113 and a zeta potential of -2.47 mV. Using

the technique of *HS-SPME* coupled to GC-FID, a percentage of encapsulation efficiency of 31.85% was determined for the EUG-loaded NP. The shelf life study showed that tomatoes treated with AL-NP-EUG held firm longer than those without the coating. In addition, for the pathogenicity test, it was shown that tomatoes with AL-NP-EUG did not show signs of damage caused by the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporoides*. It was concluded that the formulation of EUG nanoencapsulated and incorporated into the edible coating has high potential for its application as a natural nanopreservative of fruit and vegetable products such as tomato.

Keyword: Shelf-life, edible coatings, eugenol, polymeric nanoparticles, and gas chromatography.

INTRODUCCIÓN

México actualmente se encuentra entre los 10 principales países productores de productos agroalimentarios a nivel mundial. El jitomate (*Solanum lycopersicum*) es uno de los productos hortofrutícolas más importantes de México. Lamentablemente, su misma naturaleza, las deficiencias en la tecnología postcosecha y el ataque de fitopatógenos ocasionan que, en general, los productos hortofrutícolas, presenten una vida útil muy corta y pérdidas postcosecha de hasta el 50% de la producción total, según información de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2011). En los últimos años, el uso de conservadores naturales en la industria alimentaria se ha vuelto tendencia debido a la demanda de los consumidores por los productos naturales. En particular, los aceites esenciales (AE) son metabolitos secundarios de las plantas aromáticas y tienen una amplia gama de actividades biológicas (e.g. antioxidante y antimicrobiana) que los han hecho emerger como una alternativa para el control y reducción de pérdidas postcosecha (Pandey *et al.*, 2017; Ju *et al.*, 2019). De hecho, las propiedades antimicrobianas de los AE y sus componentes se han aprovechado para controlar hongos y bacterias fitopatógenas (Camele *et al.*, 2012; Choudhary *et al.*, 2017). El eugenol (EUG) es un derivado fenólico conocido comúnmente

*Autor para correspondencia: Sergio Arturo Galindo Rodríguez
 Correo electrónico: sagrod@yahoo.com.mx

Recibido: 6 de abril de 2021

Aceptado: 18 de agosto de 2021

como esencia de clavo, que se extrae de los AE de pimienta, laurel, canela y alcanfor, entre otros. Se ha demostrado que el EUG presenta una actividad antimicrobiana importante contra bacterias y hongos (Marchese *et al.*, 2017), además, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) lo ha clasificado como sustancia GRAS (Generalmente Reconocido Como Seguro) y ha sido aprobado por la Comisión Europea como aditivo en alimentos (Prates *et al.*, 2019). Lamentablemente, la aplicación de compuestos como el EUG, como aditivos alimentarios, tiene limitaciones ya que presentan un fuerte carácter lipofílico, alta volatilidad, son insolubles en agua y se deterioran con facilidad por factores ambientales, como la luz y el oxígeno, lo que dificulta su incorporación en productos comerciales (Asbahani *et al.*, 2015; Feyzioglu and Tornuk, 2016). En años recientes, la nanotecnología en la industria de los alimentos ha presentado un desarrollo importante, ofreciendo nuevas alternativas para superar estos impedimentos. La nanoencapsulación supone la incorporación, adsorción, solubilización o dispersión de compuestos bioactivos (e.g. EUG) en o sobre una estructura polimérica a escala nanométrica. La incorporación de estos biocompuestos en nanopartículas poliméricas (NP) a base de polímeros preformados (e.g. Eudragit L 100-55) puede protegerlos contra la degradación, mejorando así su estabilidad física y química. Además, la combinación de estas NP con los denominados recubrimientos comestibles (RC) ha surgido como una alternativa importante en la conservación de alimentos. Un RC se define como una capa continua y delgada, de algún material, que es incorporada sobre el alimento. El alginato (AL) es un polisacárido aniónico lineal glicosídico constituido por unidades monoméricas de *D*-manuronato y *L*-guluronato y es obtenido principalmente de dos fuentes: las algas pardas (*Phaeophyceae*) (40% de la materia seca) y bacterias (Guerreiro *et al.*, 2015; Zia *et al.*, 2015). Este polímero se ha utilizado en la industria alimentaria como material de recubrimiento o empaque, además, también es reconocido por la FDA como sustancia GRAS. Se ha estudiado la incorporación de nanomateriales y antimicrobianos, incluidos aceites esenciales y sus componentes, en RC para dar nuevas propiedades al recubrimiento y mejorar la seguridad y vida útil de frutas y verduras (Correa-Pacheco *et al.*, 2017; Piña-Barrera *et al.*, 2019). En este contexto, un sistema combinado de NP, RC y compuestos que exhiben actividad biológica, como el EUG, puede tener potencial como alternativa a los conservadores agroquímicos sintéticos.

Por lo anterior, el presente estudio se enfocó a evaluar la eficacia de un sistema combinado de NP-EUG con un RC de alginato para extender la vida útil del jitomate (*Solanum lycopersicum*) e inhibir la acción fitopatogénica de *Colletotrichum gloeosporoides*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El alginato (PM 216,12 g mol⁻¹) y el EUG (*Eugenol Reagent Plus* 99 %) se adquirieron de la marca Sigma Aldrich[®]. El alcohol polivinílico (Mowiol 4-88 con un PM 26,000 g mol⁻¹ y

grado de hidrólisis de 88 %) fue amablemente donado por Omya AG. Se utilizaron jitomates (*Solanum lycopersicum*) comerciales los cuales presentaron características homogéneas de color, textura y tamaño para los ensayos de vida útil. La acetona y el metanol fueron adquiridos de la marca TEDIA[®]. El polímero Eudragit L 100-55 (Ácido metacrílico: Acrilato de etilo (1:1), PM 320,000 Da) fue amablemente donado por Evonik Industries[®]. El hidróxido de sodio fue adquirido de la marca MERCK[®] y la fibra de SPME Carboxen/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) de 75 µm de la marca Supelco-Sigma Aldrich[®].

Nanoformulación con eugenol y su incorporación en un recubrimiento comestible

Las NP con EUG se prepararon mediante la técnica de nanoprecipitación (Fessi *et al.*, 1989), para ello se inyectaron 4 mL de fase orgánica que contenía el polímero Eudragit L 100-55 (55 mg) y el EUG (60 mg) disueltos en acetona, en una fase acuosa (25 mL) que contenía el tensoactivo PVA al 0.5 % (p/p). La difusión de la fase orgánica en la fase acuosa indujo la agregación del polímero Eudragit L 100-55 y, por tanto, la encapsulación del EUG (NP-EUG) en su interior. Finalmente, el disolvente se eliminó utilizando un rotaevaporador (Control Laborota 4003, Heidolph Instruments, GER). Las NP sin EUG (NP-BCO) se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

El tamaño promedio de partícula y el índice de poli-dispersidad (IP) de las NP-EUG se midieron en un ángulo de dispersión de 90 grados utilizando la dispersión dinámica de la luz, mientras que, la medición del potencial zeta se realizó mediante microelectroforesis láser doppler (Zetasizer Nano-ZS90, Malvern Instruments, UK).

Para la formación del recubrimiento comestible se usó AL como agente formador. El AL sólido se incorporó en una dispersión acuosa de NP-EUG con agitación magnética hasta su completa disolución.

Análisis de la nanoformulación por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (CG-FID) y microextracción en fase sólida modalidad headspace (HS-SPME)

Para determinar el porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE), la dispersión de NP-EUG se centrifugó (Centrifuga Allegra 64R, Beckman Coulter, USA) y el sedimento formado por las NP-EUG se sometió a la técnica de HS-SPME utilizando una fibra de carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) de 75 µm de espesor de recubrimiento para cuantificar el EUG en las NP por CG-FID (Clarus 480, Perkin Elmer, USA). Para el método cromatográfico se utilizó una columna capilar (Elite-5, Perkin Elmer, USA) (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm). Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 270 °C. La temperatura del horno se programó de la siguiente manera: 70 °C durante 1 min, se incrementó en 30 °C min⁻¹ a 190 °C, se incrementó en 10 °C min⁻¹ hasta 210 °C y finalmente se aumentó en 20 °C min⁻¹ hasta 270 °C y se mantuvo durante 1 min. El flujo del gas portador helio (99.999 % de pureza,

INFRA[®]) fue de 1 mL min⁻¹. Posteriormente, el porcentaje de eficiencia de encapsulación (% EE) se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\%EE = (EUGc/EUGt) \times 100 \quad (1)$$

Donde *EUGc* es la cantidad EUG cuantificada en las NP-EUG (mg) y *EUGt* es la cantidad de EUG (mg) total utilizado en la fase orgánica de la nanoformulación.

Evaluación del efecto conservador de la nanoformulación en combinación con un recubrimiento comestible sobre los parámetros de vida útil del jitomate

Se seleccionaron jitomates (*Solanum lycopersicum*) con características homogéneas de color (maduración), tamaño y sin daño mecánico para la aplicación de los diferentes tratamientos. Se lavaron con agua destilada y se secaron. Los frutos se distribuyeron en cinco grupos de tres jitomates cada uno. El primer grupo se usó como CONTROL (sin tratamiento). El segundo grupo se puso en contacto por inmersión con una solución de AL (ALG) al 0.5 % (p/p) por 1 min. Al tercer grupo se le aplicó por inmersión, en las mismas condiciones anteriores, un tratamiento de RC de AL con EUG sin nanoencapsular (ALG-EUG). El cuarto grupo fue tratado con una dispersión de NP sin activo, es decir, sin EUG (NP-BCO). Finalmente, al quinto grupo se le aplicó por inmersión una dispersión acuosa del RC de AL al 0.5 % (p/p) con la nanoformulación con EUG incorporado (ALG-NP-EUG). Todos los grupos se mantuvieron a 25 °C y 35 % de humedad durante 16 días. Transcurrido este tiempo, a cada grupo se le hicieron las evaluaciones mencionadas a continuación:

Evaluación de la firmeza. La firmeza de los jitomates se midió utilizando un Texturómetro (CT3 Texture Analyzer, Brookfield-Ametek, USA) equipado con una sonda cilíndrica de 2 mm de diámetro. La firmeza se expresó en Newton (N).

Evaluación del cambio de color. Los valores de color (CIE L* a* y b*) de los jitomates se determinaron por medición directa de la superficie del fruto utilizando un colorímetro (ColorFlex EZ, HunterLab, USA). El cambio de color total (ΔE) se midió utilizando la siguiente ecuación:

$$\Delta E^* = ((L^*_1 - L^*_2)^2 + (a^*_1 - a^*_2)^2 + (b^*_1 - b^*_2)^2)^{1/2} \quad (2)$$

Donde ΔE^* es el cambio de color total. L^*_1 / L^*_2 es luminosidad inicial/luminosidad obtenida. a^*_1 / a^*_2 es el color rojo-verde inicial/color rojo-verde obtenido y b^*_1 / b^*_2 es el color amarillo-azul inicial/color amarillo-azul obtenido.

Evaluación del contenido de sólidos solubles totales. El contenido de sólido soluble totales (SST) del jugo de jitomate se obtuvo de manera directa por refractometría (Abbemat 200, AntonPaar, AUT).

Evaluación de acidez titulable. Para el análisis de la calidad postcosecha de los frutos, se determinó la acidez titulable

(AT) mediante valoración del jugo de jitomate usando una solución de NaOH al 0.1 N hasta el final de la valoración (pH = 8.2). El resultado se expresó en gramos de ácido cítrico por 100 mL de jugo.

Todos los parámetros se determinaron por triplicado al principio y al final del estudio de vida útil. Además, los resultados se analizaron en el programa estadístico Startical Product and Service Solutions (SPSS Statistics versión 23) mediante una ANOVA ($p = 0.05$).

Evaluación del efecto protector de la nanoformulación en combinación con el recubrimiento comestible sobre frutos de jitomate inoculados con el fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporoides*

Los frutos de jitomates fueron limpiados y desinfectados. Se les aplicó cada uno de los tratamientos por inmersión. En condiciones de asepsia, se realizaron tres heridas sobre su superficie. En una de ellas se inoculó el fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporoides* por estría y otra herida por punción. Los frutos se colocaron en una cámara de humedad a 25 °C durante 5 días. Al finalizar, se observó ausencia o presencia del crecimiento del fitopatógeno en el jitomate.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención y caracterización fisicoquímica de la nanoformulación con eugenol

De manera general, los polímeros Eudragit han sido utilizados para modificar los perfiles de liberación de fármacos ofreciendo propiedades protectoras y de liberación sostenida (Piña-Barrera *et al.*, 2019). Debido a las propiedades exhibidas por dichos polímeros (e.g. buena estabilidad, liberación controlada y enmascaramiento de sabor y olor), su uso confiere protección a los componentes bioactivos de naturaleza química inestable, no solo en la industria farmacéutica, sino también en la industria alimentaria. En el presente estudio se utilizó el polímero Eudragit L 100-55, el cual es un copolímero aniónico derivado del ácido acrílico y metacrílico (Figura 1).

Este polímero resulta ser muy atractivo para su uso en la industria alimentaria, ya que presenta excelentes pro-

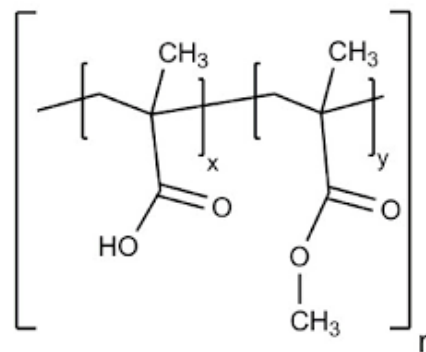


Figura 1. Estructura básica del polímero Eudragit L 100 55.

Figure 1. Basic structure of the polymer Eudragit L 100 55.

iedades de enmascaramiento de sabores desagradables, así como liberación controlada de forma dependiente del pH (Contri *et al.*, 2013). En el presente estudio se obtuvieron NP-BCO con un tamaño promedio de 164.2 ± 6.6 nm, un IP de 0.084 ± 0.018 y un potencial zeta de -1.80 ± 0.64 . Las características fisicoquímicas para la nanoformulación NP-EUG se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de las NP-BCO y de la nanoformulación con eugenol incorporado obtenida por la técnica de nanoprecipitación. ($n=3$; $\bar{x} \pm DS$).

Table 1. Physicochemical characteristics of NP-BCO and nanoformulation with incorporated eugenol obtained by the nanoprecipitation technique. ($n=3$; $\bar{x} \pm DS$).

	TAMAÑO (nm)	IP ¹	POTENCIAL ZETA (mV)	% EE ²
NP-BCO	164.0 ± 6.6	0.084 ± 0.018	-1.80 ± 0.64	NA
NP-EUG	171.0 ± 3.0	0.113 ± 0.036	-2.47 ± 0.61	31.85 ± 12.77

¹ Índice de polidispersidad que varía de 0 a 1. Un valor más alto corresponde a una distribución de tamaño menos homogénea; ² Porcentaje de eficiencia de encapsulación; NA: NP sin eugenol.

La técnica de nanoprecipitación ha sido utilizada exitosamente para la encapsulación de AE y sus componentes, como el EUG (Pascoli *et al.*, 2018; Fraj *et al.*, 2019; Lammari *et al.*, 2020). La incorporación de estos componentes inestables al medio ambiente en NP puede ofrecer ventajas para su aplicación e incorporación en productos comerciales de la industria alimentaria. Por ejemplo, debido a su tamaño nanométrico y carácter multiparticulado, las NP cargadas con EUG pueden mejorar la interacción NP/superficie del fruto y, posteriormente liberar gradualmente el EUG (Boehm *et al.*, 2003; Sotelo-Boyás *et al.*, 2017). Además, en comparación con partículas grandes (e.g. micropartículas), los nanosistemas presentan una mejor relación superficie/volumen, por lo tanto, es posible tener mayor superficie del fruto en contacto directo con las NP (Granata *et al.*, 2018). Además, la pared del polímero de las NP permite retener el EUG dentro de la estructura, disminuyendo así su velocidad de evaporación, favoreciendo su aplicación, aumentando el tiempo de residencia en la superficie del alimento y mejorando la incorporación del EUG en sistemas acuosos (He and Hwang, 2016). El tamaño promedio de las NP-EUG (i.e. 171.0 ± 3.0 nm) fue similar al reportado por Gomes, Moreira and Castell-Perez (2011) quienes obtuvieron NP de PLGA con EUG incorporado de un tamaño promedio de 179 nm. Además, los autores reportan que en los ensayos de liberación realizados se presentó una tasa de liberación más lenta del EUG incorporado dentro de las NP, lo que mejoraría su aplicación general.

Por otro lado, el IP es un parámetro asociado a la homogeneidad de la dispersión del nanosistema. Para este estudio, el valor IP de las NP-EUG fue de 0.113 ± 0.036 , lo que indica una alta homogeneidad de nanopartículas que permitiría que las interacciones individuales de las NP (e.g. bioadhesión y liberación de EUG) también sean homogéneas en la superficie del fruto. Para el equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments) utilizado, los valores de IP varían de 0

a 1. Un valor inferior a 0.200 indica una distribución homogénea del tamaño de nanopartículas (Galindo-Rodriguez *et al.*, 2004).

El potencial electrostático en el límite que divide la capa compacta y la capa difusa de las partículas coloidales, llamado potencial zeta, fue de -2.47 mV para las NP-EUG. Este potencial negativo puede atribuirse a las moléculas del polímero aniónico formador de la pared polimérica (Eudragit L 100-55) que imparte una carga negativa a las NP obtenidas debido a sus grupos de ácido metacrílico. El potencial zeta de las NP depende principalmente de la naturaleza química del polímero, además de la naturaleza química del agente estabilizador. Por lo tanto, cuando se preparan NP a partir de polímeros derivados de metacrilatos utilizando agentes estabilizantes no iónicos, se obtienen valores de potencial zeta negativos debido a la presencia de grupos carboxílicos terminales del polímero (Mora-Huertas, Fessi and Elaissari, 2010). Por tanto, se deduce que el Eudragit formó efectivamente una envoltura que constituye la pared exterior de las nanopartículas. El núcleo corresponderá al EUG nanoencapsulado. De igual manera, el potencial zeta puede considerarse como un indicador de la estabilidad de las dispersiones de NP. Aunque se considera como regla general que valores absolutos alrededor de 30 mV proporcionan una buena estabilidad, cuando se utilizan tensioactivos (i.e. PVA), que actúan principalmente por estabilización estérica, valores por debajo de 20 mV o mucho más bajos pueden proporcionar una estabilización suficiente de las dispersiones (Galindo-Rodriguez *et al.*, 2004; Honary and Zahir, 2013). Este potencial negativo también es importante porque podría facilitar la interacción del NP-EUG con la membrana de microorganismos fitopatógenos lo que aseguraría que la interacción del EUG fuera directamente desde la NP al microorganismo, mejorando, por lo tanto, su efectividad antimicrobiana (Wang, Hu and Shao, 2017).

Para completar la caracterización fisicoquímica de las NP-EUG se extrajo el EUG de las NP utilizando la técnica de HS-SPME y se cuantificó por un método analítico por CG-FID para determinar la eficiencia de encapsulación (%EE) (Tabla 1) utilizando la ecuación (1). Con respecto a la técnica de HS-SPME, se utilizó una fibra CAR/PDMS de 75 μ m debido a que el EUG es un componente parcialmente polar (Log Po/w = 2.7) de bajo peso molecular (164.20 g mol⁻¹) que tiene afinidad por este tipo de fibras. En la Figura 2 se muestra el cromatograma del EUG extraído por la técnica de HS-SPME

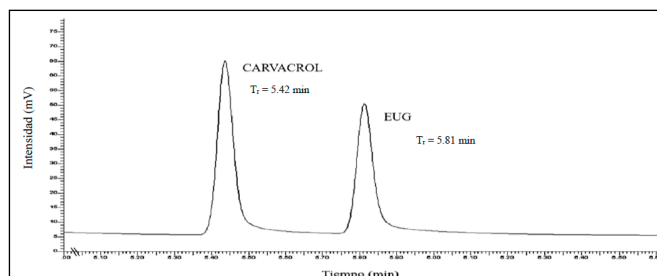


Figura 2. Cromatograma del EUG ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) y carvacrol ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) con el recubrimiento de CAR/PDMS ($75 \mu\text{m}$) por CG-FID.

Figure 2. Chromatogram of EUG ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) and carvacrol ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) coated with CAR/PDMS ($75 \mu\text{m}$) by GC-FID.

y el estándar interno (carvacrol) utilizado para determinar el %EE por el método analítico por CG-FID (Figura 2).

El %EE obtenido para las NP-EUG fue de 31.85 ± 12.77 (Tabla 1) lo que indica que más del 30 % del EUG añadido durante la formulación quedó encapsulado en la NP utilizando la técnica de nanoprecipitación, por lo tanto, es probable que este compuesto activo se libere gradualmente desde la NP a la superficie de la fruta.

Evaluación del efecto conservador de la nanoformulación en combinación con un recubrimiento comestible sobre los parámetros de vida útil del jitomate (*Solanum lycopersicum*)

Firmeza. En la Figura 3 se detallan los resultados de los ensayos de firmeza realizados en jitomates después de 16 días de almacenamiento a temperatura ambiente. La firmeza de los jitomates fue de 1.5 N al comienzo del experimento. Este parámetro disminuyó para todos los grupos de jitomates analizados. Se observó una disminución del 42.7 % de la firmeza en los jitomates sin ningún tratamiento (CTRL) (0.86 N). Los jitomates tratados con ALG (0.68 N) y con ALG-EUG (0.71 N) presentaron una pérdida del 54.7 y 52.7 % respectivamente, mientras que los jitomates tratados con NP-BCO (0.87 N) tuvieron un valor de firmeza similar a la inicial. No se encontró diferencia significativa entre los grupos ALG, ALG-EUG y NP-BCO respecto al grupo CTRL.

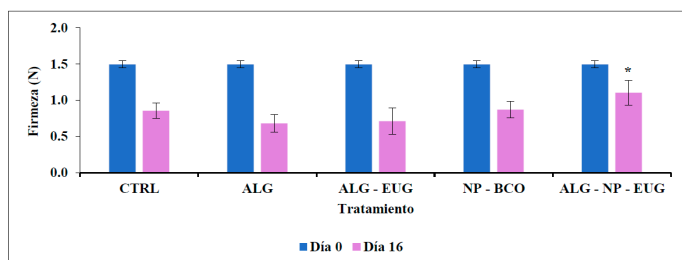


Figura 3. Firmeza, día 0 y día 16, de jitomates después del almacenamiento durante 16 días a 25 °C. CTRL = sin tratamiento, ALG = alginato, ALG-EUG = alginato + eugenol libre, NP-BCO = NP sin activo, ALG-NP-EUG = alginato + NP con eugenol. ($n=3$; $\bar{x} \pm DS$).

* Diferencia significativa respecto al grupo CTRL.

Figure 3. Firmness, day 0 and day 16, of tomatoes after storage for 16 days at 25 °C. CTRL = no treatment, ALG = alginate, ALG-EUG = alginate + free eugenol, NP-BCO = NP without active, ALG-NP-EUG = alginate + NP with eugenol. ($n=3$; $\bar{x} \pm DS$).

*Significant difference with respect to the CTRL group.

Los jitomates tratados con las NP-EUG en combinación con el RC (ALG-NP-EUG) presentaron una mayor firmeza (1.10 N) en comparación a los cuatro tratamientos anteriores, representando tan solo un 22 % de pérdida en comparación con los frutos sin tratamiento (CTRL). Esta diferencia fue estadísticamente significativa. La firmeza de las frutas y hortalizas está relacionada con la estructura de la pared celular, la cual depende de la turgencia, la cohesión, la forma y el tamaño de las células que la conforman. La pérdida de agua está relacionada íntimamente con la pérdida de turgencia de las células del mesocarpio, disminuyendo la firmeza del fruto (Vicente

et al., 2007). En este trabajo, la presencia del RC ALG-NP-EUG pudo interferir con la disminución en la tasa de transpiración del fruto, lo que resultó en una menor pérdida de firmeza por parte de los jitomates tratados. De igual manera, la pérdida de firmeza está relacionada a un aumento de la actividad de las enzimas hidrolíticas (i.e. poligalacturonasa) que actúan sobre las pectinas de la pared celular, lo que ocasiona cambios en los tejidos, que a su vez provoca el ablandamiento del fruto (Navarro-López *et al.*, 2012). Esta actividad enzimática es baja durante la primera etapa del desarrollo del fruto, luego aumenta y alcanza un máximo en la etapa climatérica del proceso de maduración (Yao *et al.*, 2014). Resultados similares fueron reportados Fagundes *et al.*, (2014) quienes obtuvieron resultados de firmeza similares a los iniciales en tomates tratados con recubrimientos de hidroxipropil metilcelulosa y cera de abejas después de 15 días de almacenamiento. Los autores atribuyen esta retención de firmeza en los tomates recubiertos a la reducción en las actividades enzimáticas causada por la modificación de la atmósfera interna de la fruta. Es decir, a una menor tasa de respiración. De igual manera, en nuestro estudio, el AL del RC ALG-NP-EUG tuvo la capacidad de actuar como una barrera que interfirió el intercambio gaseoso, lo cual condujo a la reducción de la tasa de respiración de los jitomates y evitó la pérdida de agua; además, es posible que la actividad biológica del EUG nanoencapsulado disminuyera la actividad enzimática del fruto, dando como resultados una maduración más lenta.

Cambio de color. En cuanto al color, en la industria alimentaria, para medir el cambio de color en un producto como el jitomate, se han establecido coordenadas expresadas en valores numéricos que permiten correlacionar el color con la madurez. En este estudio, los cambios de color fueron determinados por la escala de color CIE L a* b*, donde a* es la coordenada roja/verde (+a* indica más rojo y -a* indica más verde), mientras que b* es la coordenada amarilla/azul (+b* indica más amarillo y -b* indica más azul). En la Figura 4 se muestra el análisis de los 3 valores de las coordenadas obtenidas, presentados como el cambio de color (ΔE), utilizando la ecuación (2), producido en cada uno de los

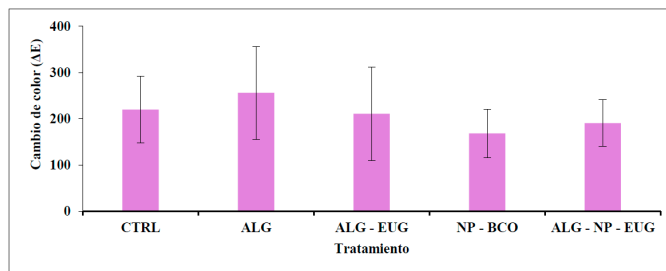


Figura 4. Cambio de color de jitomates después del almacenamiento durante 16 días a 25 °C. CTRL = sin tratamiento, ALG = alginato, ALG-EUG = alginato + eugenol libre, NP-BCO = NP sin activo, ALG-NP-EUG = alginato + NP con eugenol. ($n=3$; $\bar{x} \pm DS$).

Figure 4. Color change of tomatoes after storage for 16 days at 25 °C. CTRL = no treatment, ALG = alginate, ALG-EUG = alginate + free eugenol, NP-BCO = NP without active, ALG-NP-EUG = alginate + NP with eugenol. ($n=3$; $\bar{x} \pm DS$).

grupos tratados y almacenados por 16 días. Se obtuvo un valor ΔE de 219.75 para el CTRL, 255.71 para ALG y 210.80 para ALG-EUG, 167.76 para el NP-BCO y 190.47 para el RC ALG-NP-EUG. Un menor cambio de color es interpretado como una preservación de la calidad del jitomate. Aunque no hubo una diferencia significativa entre los grupos, puede observarse que la presencia de las NP en combinación con el RC de ALG en la superficie del fruto pudieron tener un efecto en la conservación del color. Es importante mencionar que el jitomate, al alcanzar su madurez comercial, sufre cambios mínimos en cuanto a su coloración, algo característico en los frutos climatéricos. Diferentes autores han mencionado que la aplicación de recubrimientos puede retrasar los cambios de color en los tomates durante el almacenamiento al crear una atmósfera modificada en la fruta (Ali *et al.*, 2010; Gomes, Moreira and Castell-Perez, 2011)

Sólidos solubles totales y acidez titulable. Los SST de las frutas tienden a aumentar durante la maduración. El valor de SST (Figura 5) para los jitomates al comienzo del experimento fue de 3.64 °Brix. Después de 16 días de almacenamiento, este parámetro aumentó para los jitomates control (4.83 °Brix), así como para los jitomates tratados con el ALG-EUG (4.74 °Brix), ALG (5.21 °Brix), NP-CO (5.08 °Brix) y el RC ALG-NP-EUG (4.31 °Brix).

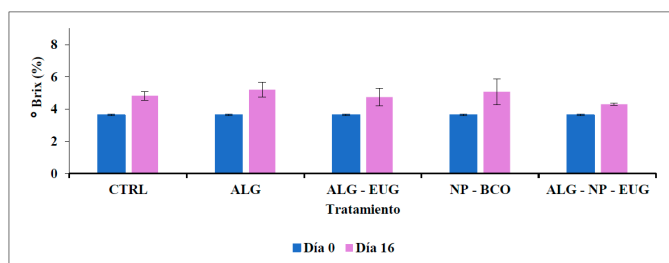


Figura 5. Sólidos solubles totales, día 0 y día 16, de jitomates después del almacenamiento durante 16 días a 25 °C. CTRL = sin tratamiento, ALG = alginato, ALG-EUG = alginato + eugenol libre, NP-BCO = NP sin activo, ALG-NP-EUG = alginato + NP con eugenol. ($n=3$; $\bar{x} \pm DS$).

Figure 5. Total soluble solids, day 0 and day 16, of tomatoes after storage for 16 days at 25 °C. CTRL = no treatment, ALG = alginate, ALG-EUG = alginate + free eugenol, NP-BCO = NP without active, ALG-NP-EUG = alginate + NP with eugenol. ($n=3$; $\bar{x} \pm DS$).

El aumento de los SST durante el almacenamiento es debido a la respiración. Durante el proceso de maduración, la acumulación de azúcar dependerá de la degradación del almidón, principal compuesto de almacenamiento energético en el jitomate verde. Además, la actividad metabólica continúa como resultado de la maduración de la fruta, lo que conduce a la conversión de carbohidratos y ácidos orgánicos en azúcares para ser utilizados en varios procesos metabólicos (Guerreiro *et al.*, 2015). Por otro lado, comparado con el grupo control, el recubrimiento en combinación con las NP-EUG (ALG-NP-EUG), mostró los valores más bajos de SST. Este comportamiento podría atribuirse a la presencia del RC de AL y una sinergia con las NP-EUG, lo que ocasiona

una desaceleración más efectiva de la respiración y la actividad metabólica, retrasando el proceso de maduración de los frutos. Estos resultados son similares a lo reportado por Sucharitha, Beulah and Ravikiran (2018) quienes trataron tomates con recubrimientos de quitosano y reportaron una diferencia significativa al final del período de almacenamiento (15 días) entre las muestras revestidas y no revestidas con el quitosano. En nuestro estudio, se observó una diferencia de los SST entre el RC ALG-NP-EUG (4.31 °Brix) y el ALG solo (5.21 °Brix). Esto podría deberse a que la presencia de las NP con EUG encapsulado en la superficie del fruto se prolongue por más tiempo y que, además de las propiedades de barrera del recubrimiento, la liberación sostenida del EUG de las NP podría haber extendido la actividad biológica de EUG (e.g. antioxidante) en la superficie del jitomate, lo que contribuyó a tener una mejor conservación de los frutos.

Finalmente, como se muestra en la Figura 6, la AT de los jitomates fue de 1.6 g 100 mL⁻¹ al comienzo del experimento y después de 16 días de almacenamiento, los valores de AT disminuyeron para todos los grupos. Esta reducción de los valores de AT está asociada al metabolismo de los ácidos orgánicos en las frutas durante el proceso de maduración. Lo ácidos orgánicos son responsables de la acidez de la fruta que se expresa como AT. Durante la maduración de los jitomates, la cantidad de ácidos orgánicos disminuye, y esto es debido a que los ácidos orgánicos son metabolizados, principalmente, para asegurar el suministro adicional de carbono para la obtención de sacarosa, glucosa y fructosa en la fruta (Fabi *et al.*, 2007). En cuanto a los grupos de jitomates con tratamientos, los resultados de AT tuvieron la misma tendencia que los obtenidos para SST. Después de 16 días de almacenamiento, los jitomates del grupo control tuvieron la disminución más importante de AT, mientras que las del ALG-NP-EUG la disminución más baja de AT. Esto significa que el recubrimiento en combinación con las NP-EUG fue el tratamiento más efectivo para retrasar la maduración, lo que puede atribuirse a la presencia del recubrimiento de AL que actuó como una barrera y disminuyó la tasa de respiración (metabolismo) de los jitomates.

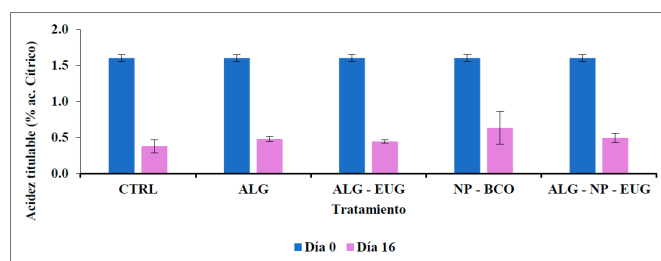


Figura 6. Acidez titulable, día 0 y día 16, de jitomates después del almacenamiento durante 16 días a 25 °C. CTRL = sin tratamiento, ALG = alginato, ALG-EUG = alginato + eugenol libre, NP-BCO = NP sin activo, ALG-NP-EUG = alginato + NP con eugenol. ($n=3$; $\bar{x} \pm DS$).

Figure 6. Titratable acidity, day 0 and day 16, of tomatoes after storage for 16 days at 25 °C. CTRL = no treatment, ALG = alginate, ALG-EUG = alginate + free eugenol, NP-BCO = NP without active, ALG-NP-EUG = alginate + NP with eugenol. ($n=3$; $\bar{x} \pm DS$).

Evaluación del efecto protector de la nanoformulación en combinación con el recubrimiento comestible sobre frutos de jitomate inoculados con el fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*.

El cultivo de jitomate es afectado por diversas enfermedades postcosecha, las cuales muchas de ellas son ocasionadas por hongos. Entre los principales agentes fitopatógenos postcosecha del jitomate se encuentran: *Fusarium solani*, *Botrytis cinérea*, *Alternaria alternata*, *Penicillium expansum* y, de manera particular, *Colletotrichum gloeosporioides* (Barad *et al.*, 2017). En el presente estudio, jitomates con cada uno de los tratamientos antes mencionados se les inoculó por punción el fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* y se observó su desarrollo durante 5 días a temperatura ambiente en cámaras de humedad. Los resultados se observan en la Figura 7. Después de 5 días, los jitomates tratados con el RC ALG-NP-EUG no presentaron crecimiento del hongo (Figura 7-E), mientras que el resto de los frutos presentaron colonias características del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. Esta protección se debe a la capacidad antimicrobiana y el efecto sobre fitopatógenos del EUG (Abbaszadeh *et al.*, 2014; Marchese *et al.*, 2017; Davy *et al.*, 2020). Hong *et al.*, 2015 demostraron que el AE de clavo y el eugenol presentaron una importante inhibición del crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* por medio de la reducción del diámetro de una lesión en pimiento verde inmaduros inoculados con este fitopatógeno. Además, la incorporación del EUG en la estructura polimérica de la NP puede ocasionar un aumento en el tiempo de residencia en la superficie del fruto al disminuir su rápida evaporación al aplicarse de manera libre.

Se ha propuesto que el mecanismo de acción de la actividad antifúngica de los componentes de los AE parece depender de su estructura química y de su capacidad para atravesar la pared celular y penetrar entre las cadenas de ácidos grasos de la bicapa lipídica, haciendo que la membrana celular sea mucho más permeable y, como resultado, ocasio-

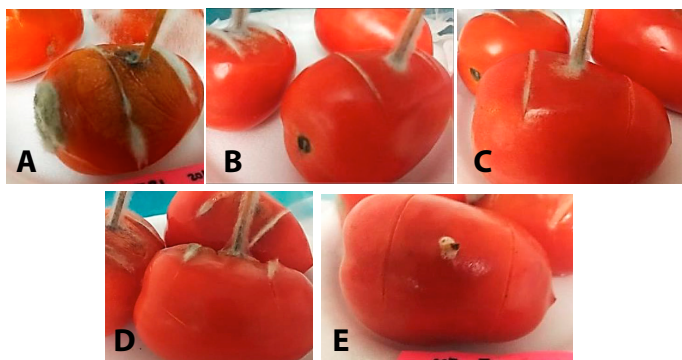


Figura 7. Prueba de patogenicidad con *C. gloeosporioides* después de 5 días de almacenamiento de tomates con diferentes tratamientos. A) = control, B) = alginato, C) = alginato + eugenol libre, D) = NP blanco, E) ALG-NP-EUG. ($n=3$; $\bar{x} \pm DS$).

Figure 7. Pathogenicity test with *C. gloeosporioides* after 5 days of storage of tomatoes with different treatments. A) = control, B) = alginate, C) = alginate + free eugenol, D) = blank NP, E) ALG-NP-EUG. ($n=3$; $\bar{x} \pm DS$).

nan la muerte celular o la inhibición de la esporulación y la germinación de hongos u otros microorganismos causantes del deterioro (Wattanasatcha, Rengpipat and Wanichwecharungruang, 2012; Diao *et al.*, 2014; Grande-Tovar *et al.*, 2018). Tomando en cuenta este mecanismo, el EUG incorporado en las NP en combinación con el RC ayudó a tener un contacto más íntimo y prolongado entre el activo y los microorganismos en la superficie de la fruta.

CONCLUSIONES

Las propiedades fisicoquímicas de los componentes individuales del RC en combinación con NP-EUG contribuyeron positivamente a retrasar la maduración de los jitomates y protegerlos de fitopatógenos como el *Colletotrichum gloeosporioides*. Mientras que el RC de AL actuó como una barrera que redujo la transpiración y el metabolismo de las frutas, el EUG con actividad antimicrobiana evitó el crecimiento del microorganismo fitopatógeno. Además de esto, debido a su tamaño y carácter multiparticulado, las NP con EUG incorporado pudieron distribuirse de manera más uniforme en la superficie del fruto, liberando al EUG de manera gradual y aumentando su tiempo de residencia en la fruta. Esto demuestra que el EUG nanoencapsulado en combinación con RC son una alternativa favorable a los métodos tradicionales de conservación.

AGRADECIMIENTOS

Al financiamiento otorgado mediante los proyectos UANL-PAICYT IT1919-21 y CN1614-21 y al CONACYT por la beca 273928.

REFERENCIAS

- Abbaszadeh, S. *et al.* (2014) 'Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi', *Journal de Mycologie Medicale*. Elsevier Masson SAS, 24(2), pp. e51–e56. doi: 10.1016/j.mycmed.2014.01.063.
- Ali, A. *et al.* (2010) 'Gum arabic as a novel edible coating for enhancing shelf-life and improving postharvest quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier, 58(1), pp. 42–47. doi: 10.1016/j.postharvbio.2010.05.005.
- Asbahani, A. El *et al.* (2015) 'Essential oils: From extraction to encapsulation', *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V., 483(1–2), pp. 220–243. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.069.
- Barad, S. *et al.* (2017) 'Differential gene expression in tomato fruit and *Colletotrichum gloeosporioides* during colonization of the RNAi-SIPH tomato line with reduced fruit acidity and higher pH', *BMC Genomics*. BioMed Central Ltd., 18(1). doi: 10.1186/s12864-017-3961-6.
- Boehm, A. L. *et al.* (2003) 'Nanoprecipitation technique for the encapsulation of agrochemical active ingredients', *Journal of Microencapsulation*, 20(4), pp. 433–441. doi: 10.1080/0265204021000058410.

- Camele, I. et al. (2012) 'In vitro control of post-harvest fruit rot fungi by some plant essential oil components', *International Journal of Molecular Sciences*. Molecular Diversity Preservation International, 13(2), pp. 2290–2300. doi: 10.3390/ijms13022290.
- Choudhary, D. K. et al. (2017) *Volatiles and food security: Role of volatiles in agro-ecosystems*, *Volatiles and Food Security: Role of Volatiles in Agro-Ecosystems*. Springer Singapore. doi: 10.1007/978-981-10-5553-9.
- Contri, R. V. et al. (2013) 'Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: Influence on the physicochemical properties', *Journal of Experimental Nanoscience*, 8(7–8), pp. 913–924. doi: 10.1080/17458080.2011.620019.
- Correa-Pacheco, Z. N. et al. (2017) 'The Effect of Nanostructured Chitosan and Chitosan-thyme Essential Oil Coatings on *Colletotrichum gloeosporioides* Growth in vitro and on cv Hass Avocado and Fruit Quality', *Journal of Phytopathology*. Blackwell Publishing Ltd, 165(5), pp. 297–305. doi: 10.1111/jph.12562.
- Davy, M. et al. (2020) 'Antifungal effects of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil against *Colletotrichum gloeosporioides*, the fungus associated with papaya (*Carica papaya* L.) fruit anthracnose', *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, pp. 51–57. doi: 10.33500/ijambr.2020.08.005.
- Diao, W. R. et al. (2014) 'Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.)', *Food Control*. Elsevier Ltd, 35(1), pp. 109–116. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.06.056.
- Fabi, J. P. et al. (2007) 'Papaya fruit ripening: Response to ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP)', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), pp. 6118–6123. doi: 10.1021/jf070903c.
- Fagundes, C. et al. (2014) 'Effect of antifungal hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible coatings on gray mold development and quality attributes of cold-stored cherry tomato fruit', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier, 92, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.postharvbio.2014.01.006.
- FAO (2011) *Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention*, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Roma. doi: 10.1098/rstb.2010.0126.
- Fessi, H. et al. (1989) 'Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement', *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier, 55(1), pp. R1–R4. doi: 10.1016/0378-5173(89)90281-0.
- Feyzioglu, G. C. and Tornuk, F. (2016) 'Development of chitosan nanoparticles loaded with summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil for antimicrobial and antioxidant delivery applications', *LWT - Food Science and Technology*. Academic Press, 70, pp. 104–110. doi: 10.1016/j.lwt.2016.02.037.
- Fraj, A. et al. (2019) 'A comparative study of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil-based polycaprolactone nanocapsules/ microspheres: Preparation, physicochemical characterization, and storage stability', *Industrial Crops and Products*. Elsevier B.V., 140, p. 111669. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111669.
- Galindo-Rodriguez, S. et al. (2004) 'Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods', *Pharmaceutical Research*, 21(8), pp. 1428–1439. doi: 10.1023/B:PHAM.0000036917.75634.be.
- Gomes, C., Moreira, R. G. and Castell-Perez, E. (2011) 'Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) Nanoparticles with Entrapped trans-Cinnamaldehyde and Eugenol for Antimicrobial Delivery Applications', *Journal of Food Science*. John Wiley & Sons, Ltd, 76(2), pp. N16–N24. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01985.x.
- Granata, G. et al. (2018) 'Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation', *Food Chemistry*. Elsevier, 269, pp. 286–292. doi: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.140.
- Grande-Tovar, C. D. et al. (2018) 'Chitosan coatings enriched with essential oils: Effects on fungi involve in fruit decay and mechanisms of action', *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier, 78(May), pp. 61–71. doi: 10.1016/j.tifs.2018.05.019.
- Guerreiro, A. C. et al. (2015) 'The effect of alginate-based edible coatings enriched with essential oils constituents on *Arbutus unedo* L. fresh fruit storage', *Postharvest Biology and Technology*. Elsevier, 100, pp. 226–233. doi: 10.1016/j.postharvbio.2014.09.002.
- He, X. and Hwang, H. M. (2016) 'Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment', *Journal of Food and Drug Analysis*. Elsevier, 24(4), pp. 671–681. doi: 10.1016/j.jfda.2016.06.001.
- Honary, S. and Zahir, F. (2013) 'Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2)', *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(April), pp. 255–264. doi: 10.4314/tjpr.v12i2.20.
- Hong, J. K. et al. (2015) 'Application of volatile antifungal plant essential oils for controlling pepper fruit anthracnose by *Colletotrichum gloeosporioides*', *Plant Pathology Journal*. Korean Society of Plant Pathology, 31(3), pp. 269–277. doi: 10.5423/PPJ.OA.03.2015.0027.
- Ju, J. et al. (2019) 'Application of edible coating with essential oil in food preservation', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor & Francis, 59(15), pp. 2467–2480. doi: 10.1080/10408398.2018.1456402.
- Lammari, N. et al. (2020) 'Encapsulation of essential oils via nanoprecipitation process: Overview, progress, challenges and prospects', *Pharmaceutics*. MDPI AG, p. 431. doi: 10.3390/pharmaceutics12050431.
- Marchese, A. et al. (2017) 'Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint', *Critical Reviews in Microbiology*. Taylor and Francis Ltd, pp. 668–689. doi: 10.1080/1040841X.2017.1295225.
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H. and Elaissari, A. (2010) 'Polymer-based nanocapsules for drug delivery', *International Journal of Pharmaceutics*, 385(1–2), pp. 113–142. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.10.018.
- Navarro-López, E. R. et al. (2012) 'Calidad poscosecha en frutos de tomate hidropónico producidos con agua residual y de pozo', *Revista Chapingo, Serie Horticultura*. Universidad Autónoma Chapingo, 18(3), pp. 263–277. doi: 10.5154/r.rchsh.2009.11.097.
- Pandey, A. K. et al. (2017) 'Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives', *Frontiers in Microbiology*. Frontiers, 7(JAN), p. 2161. doi: 10.3389/fmicb.2016.02161.
- Pascoli, M. et al. (2018) 'State of the art of polymeric nanoparticles as carrier systems with agricultural applications: a minireview', *Energy, Ecology and Environment*. Joint Center on Global Change and Earth System Science of the University of Maryland and Beijing Normal University, 3(3), pp. 137–148. doi: 10.1007/s40974-018-0090-2.

- Piña-Barrera, A. M. *et al.* (2019) 'Application of a multisystem coating based on polymeric nanocapsules containing essential oil of *Thymus vulgaris* L. to increase the shelf life of table grapes (*Vitis vinifera* L.)', *IEEE Transactions on NanoBioscience*. Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), 18(4), pp. 549–557. doi: 10.1109/tnb.2019.2941931.
- Prates, L. H. F. *et al.* (2019) 'Eugenol diffusion coefficient and its potential to control *Sitophilus zeamais* in rice', *Scientific reports*. NLM (Medline), 9(1), p. 11161. doi: 10.1038/s41598-019-47562-1.
- Sotelo-Boyás, M. E. *et al.* (2017) 'Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens', *LWT - Food Science and Technology*. Academic Press, 77, pp. 15–20. doi: 10.1016/j.lwt.2016.11.022.
- Sucharitha, K. V., Beulah, A. M. and Ravikiran, K. (2018) 'Effect of chitosan coating on storage stability of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill)', *International Food Research Journal*, 25(1), pp. 93–99.
- Vicente, A. R. *et al.* (2007) 'The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: Looking to the future', *Journal of the Science of Food and Agriculture*. John Wiley & Sons, Ltd, 87(8), pp. 1435–1448. doi: 10.1002/jsfa.2837.
- Wang, L., Hu, C. and Shao, L. (2017) 'The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future', *International Journal of Nanomedicine*. Dove Press, 12, pp. 1227–1249. doi: 10.2147/IJN.S121956.
- Wattanasatcha, A., Rengpipat, S. and Wanichwecharungruang, S. (2012) 'Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent', *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V., 434(1–2), pp. 360–365. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.06.017.
- Yao, B. N. *et al.* (2014) 'The role of hydrolases in the loss of firmness and of the changes in sugar content during the post-harvest maturation of *Carica papaya* L. var solo 8', *Journal of Food Science and Technology*. Springer, 51(11), pp. 3309–3316. doi: 10.1007/s13197-012-0858-x.
- Zia, K. M. *et al.* (2015) 'Alginate based polyurethanes: A review of recent advances and perspective', *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., pp. 377–387. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.04.076.



Prevalencia de *Chlamydia abortus* en cabras con problemas de aborto en la zona centro de Sinaloa, México

Prevalence of *Chlamydia abortus* in goats with abortion problems in central Sinaloa, Mexico

Rebeca Castro-Flores¹, Soila M. Gaxiola^{1*}, Efrén Díaz-Aparicio², María M. Limón-González², Abril Romero-Jarillo², Idalia Enríquez-Verdugo¹, Nohemí Castro del Campo¹, Miguel A. Rodríguez-Gaxiola¹, Arnulfo Montero-Pardo¹, Daniel Díaz^{1,3}

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán Rosales 80246, Sinaloa, México.

² Centro Nacional de Investigación Disciplinaria Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Km 15.5, 01219 Cuajimalpa, Ciudad de México, México.

³ Centro de Ciencias de la Complejidad (C3), Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Copilco, Coyoacán 04510, Ciudad de México, México.

RESUMEN

Para determinar la prevalencia de clamidiosis en un rebaño caprino con problemas de aborto en el centro de Sinaloa, México, se realizó un estudio transversal que incluyó a siete machos y 135 hembras con parto o aborto reciente. Adicionalmente, 32 de las 135 hembras fueron seleccionadas para realizar un estudio longitudinal por dos periodos consecutivos de partos/abortos. *Chlamydia abortus* se identificó mediante aislamiento y las muestras positivas se confirmaron mediante PCR. La prevalencia de clamidiosis fue de 55.6 % en las hembras (75/135), en las cuales se presentaron 69 partos y seis abortos. Únicamente 10/75 muestras positivas fueron confirmadas por PCR. En los machos, 2/7 muestras resultaron positivas mediante aislamiento. En el estudio longitudinal, se incrementó en 41.6 veces la posibilidad (OR=0.024, IC 95 %: 0.002-0.299) de tener un resultado positivo durante el segundo período de evaluación. De acuerdo con el análisis multivariado, se presentó una asociación entre la positividad a clamidiosis, la edad de las hembras y el número de partos. Estos resultados representan el primer reporte de *C. abortus* en un rebaño caprino del estado de Sinaloa. Se requieren más estudios que evalúen la prevalencia y distribución de *C. abortus* en México para comprender mejor el impacto de la clamidiosis sobre la salud y producción animal.

Palabras claves: Aborto, Bacteria patógena, Clamidiosis, Pequeños rumiantes, Reproducción.

ABSTRACT

A cross-sectional study that included seven bucks and 132 goats with recent parturition or abortion was conducted to assess the prevalence of chlamydiosis in a caprine herd showing abortion issues in Central Sinaloa, Mexico. Additionally, 32 out of the 135 goats were selected to perform a longitudinal study throughout two consecutive periods of kidding/abortions. *Chlamydia abortus* was detected by bacterial isolation and the positive samples were confirmed by PCR. In does, chlamydiosis prevalence was 55.6 % (75/135; 69 parturitions and six abortions). Ten out of 75 positive isolations were confirmed by PCR. In bucks, two out of seven

samples tested positive for bacterial isolation. In the longitudinal study, the likelihood of showing a positive result increased 41.6 times (OR=0.024, 95 % CI: 0.002 to 0.299) during the second period of evaluation. According to multivariate analysis, chlamydiosis positivity, lower age of goats, and a reduced number of parturitions were associated. The results presented herein represent the first report of *C. abortus* in a caprine herd in the state of Sinaloa. More studies focused on the prevalence and distribution of *C. abortus* in Mexico are needed to improve the knowledge regarding the impact of chlamydiosis on animal health and production.

Keywords: Abortion; Chlamydiosis; Pathogen bacterium, Small ruminants; Reproduction.

INTRODUCCIÓN

La clamidiosis es una enfermedad infecciosa que afecta a los caprinos a nivel reproductivo, es causada por la bacteria intracelular obligada *Chlamydia abortus* que presenta una distribución mundial (Cheong *et al.*, 2019); particularmente en países con producciones intensivas de pequeños rumiantes (Van den Brom *et al.*, 2012). En el ganado caprino infectado se presenta aborto durante el último tercio de la gestación (World Organization for Animal Health (OIE), 2018). En algunos casos, las cabras infectadas paren crías prematuras y débiles que generalmente mueren durante los primeros días de vida (Kuo y Stephens, 2011). La infección es transmitida por la inhalación o la ingestión de las bacterias contenidas en las descargas vaginales y placentas de cabras que abortaron o mediante agua y alimentos contaminados (Longbottom y Coulter, 2003; Papp *et al.*, 1993). Adicionalmente, la infección también se transmite a las crías que nacieron de cabras infectadas o que son alimentados por hembras que abortaron (Amin y Wilsmore, 1995). La transmisión sexual de *C. abortus* aún no está muy estudiada; sin embargo, la detección de la bacteria en hembras durante la ovulación y después del servicio de apareamiento sugieren que se favorece la transmisión venérea de la enfermedad (Livingstone *et al.*, 2009; Papp *et al.*, 1993). El alojamiento de hembras infectadas podría desencadenar en el contagio de

sementales (Rodolakis y Souriau, 1986), aunque el papel del macho en la transmisión sexual de la enfermedad aún no está clara.

En México, desde el 2016 se incluyó a la clamidiosis dentro del grupo 3 de las enfermedades endémicas y plagas exóticas de reporte obligatorio mensual ante las autoridades zoosanitarias (Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación, 2016). De acuerdo a las autoridades de salud animal y sanidad del país, la infección causada por *C. abortus* se ubica dentro de un grupo de enfermedades de bajo riesgo desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y de comercio (Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación, 2016). No obstante, durante una primera infección se pueden producir de 30 al 90 % de abortos en las hembras afectadas (Aitken y Longbottom, 2007, Nietfeld, 2001), con lo cual el impacto productivo y económico es considerable (Longbottom, 2004). Además, las hembras que padecen infecciones crónicas tienen pocas posibilidades de recuperar su potencial productivo (Amin y Wilsmore, 1995, Entrican *et al.*, 2001). La clamidiosis representa también un riesgo zoonótico para las personas que se encuentran en contacto con los caprinos enfermos (Rodolakis y Yousef Mohamad, 2010), principalmente en personas inmunocomprometidas o embarazadas en las cuales se puede producir un aborto espontáneo (Aitken y Longbottom, 2007, Longbottom y Coulter, 2003). En consecuencia, es necesario conocer la distribución y prevalencia de *C. abortus* en los sistemas de producción para así establecer programas de monitoreo eficientes encaminados a controlar y erradicar la infección.

En el caso específico de los caprinos, el panorama epidemiológico nacional de *C. abortus* permanece aún incompleto para diferentes estados y zonas geográficas de México. Lo anterior a pesar de que diversos estudios han reportado la presencia de *C. abortus* en rebaños caprinos de Coahuila, Guanajuato, Jalisco, México, Puebla, Querétaro y Veracruz (Campos-Hernandez *et al.*, 2014, Escalante-Ochoa *et al.*, 1997, Mora *et al.*, 2015, Sánchez-Rocha, 2014, Soriano-Vargas *et al.*, 2011). Sin embargo, en el estado de Sinaloa actualmente se desconoce la presencia de *C. abortus* en los sistemas de producción caprina. De acuerdo con los datos reportados por el SIAP en 2018, Sinaloa ocupó el 13° lugar dentro del inventario caprino nacional con una población de 180,159 cabezas de ganado (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2020). A nivel estatal predominan sistemas de producción extensivos; caracterizados principalmente por pequeños rebaños (< 100 cabezas), uso de baja tecnología, mano de obra familiar, alimentación basada en pastoreo de la vegetación nativa del agostadero y nula asistencia técnica (Tovar Luna, 2009). No obstante, también existen algunas explotaciones intensivas donde se produce leche y pie de cría en los que se requiere un manejo zootécnico más estricto, así como dietas específicas para los caprinos durante cada etapa productiva.

Para evitar las pérdidas productivas ocasionadas por *C. abortus*, es necesario conocer a detalle cual es el estado

sanitario de los rebaños caprinos del país, principalmente en aquellos estados en los cuales no existe información sobre la presencia y magnitud de la infección provocada por *C. abortus*. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación consistió en realizar un estudio epidemiológico para determinar la prevalencia de *C. abortus* en un rebaño de caprinos en el centro de Sinaloa, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio, animales y diseño del estudio

Las condiciones de mantenimiento y manejo de los animales cumplieron con las recomendaciones del Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (Organización Mundial de la Salud, 2002) y la NOM-062-Z00-1999 para el manejo de animales de laboratorio (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, 2001). El estudio se realizó entre 2016 y 2017 en un rebaño caprino localizado en el poblado de Mojolo a una Latitud: 24.885833 y Longitud: -107.417500 a 60 m.s.n.m. dentro del municipio de Culiacán, en la zona centro del estado de Sinaloa. El sitio de estudio se dedica a la producción de pie de cría de registro de las razas Nubia y Boer, cuya población se compone de 250 hembras (87 de raza Boer y 163 de raza Nubia) y siete machos (2 de raza Boer y 5 de raza Nubia). El rebaño cuenta con la certificación de hatillo libre de brucelosis; sin embargo, se presentó un historial de abortos durante años previos al estudio; principalmente en las hembras de primer parto.

Los animales fueron alimentados con una dieta a base de pasto sudan, alfalfa, maíz, pasta de soya, minerales para caprinos en reproducción (TMP, México), Zeolita, melaza y aceite vegetal (18.8 % de proteína, 3.1 Mcal de EM/kg de MS, 14.2 % de fibra cruda y 80.0 % materia seca). Las épocas de parto del rebaño coinciden con los períodos de estacionalidad reproductiva de las cabras (Diaz *et al.*, 2019). En el sitio en estudio se mantiene una mezcla de hembras, las cuales van desde primíparas hasta multiparas con doce partos. Con respecto a su condición corporal, las hembras incluidas en el estudio presentaron una condición corporal entre 3 y 4, de acuerdo con la escala que va de 1 al 5, donde 1 indica un animal desnutrido y 5 un animal obeso (Honhold *et al.*, 1989).

El estudio se dividió en dos etapas. En 2016, durante la primera etapa de la investigación se realizó un estudio observacional descriptivo de tipo transversal (Donis, 2013) para determinar la presencia de *C. abortus* en las hembras del rebaño que tuvieron un parto o aborto reciente (<30 días) al momento de colección de la muestra. De esta forma, se incluyeron en el estudio 135 de las 250 hembras del rebaño, las cuales cumplieron el criterio de inclusión definido. Adicionalmente, se evaluaron los siete machos del rebaño para confirmar la posibilidad de que estos pudieran ser positivos a la presencia de la bacteria y con ello transmitir la infección de forma venérea a las hembras. La importancia de dicha evaluación se basó en que durante la época reproductiva se utilizó monta natural para gestar a las hembras. Durante la segunda etapa, se realizó un estudio longitudinal durante dos períodos consecutivos de partos/abortos en un grupo de

32 hembras, las cuales fueron seleccionadas aleatoriamente de entre las 135 hembras evaluadas durante la primera etapa. El objetivo consistió en evaluar el posible cambio de la prevalencia de *C. abortus* entre los períodos de seguimiento. En ambos casos, los estudios se realizaron entre los meses de junio a diciembre debido a la estacionalidad reproductiva de las cabras (Díaz *et al.*, 2019).

Muestras de estudio

En ambos estudios se colectaron muestras de exudado vaginal de cada una de las hembras mediante un hisopo estéril. Las muestras se colectaron de 1-30 días posteriores al evento de parto o aborto. Inmediatamente después de la colección de las muestras, estas fueron transportadas al laboratorio a una temperatura de 4 °C en tubos cónicos de polipropileno de 15 mL adicionado con 2 mL de medio de transporte SPF, que contiene: sacarosa, fosfato y glutamato, suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y 50 µg/mL gentamicina (Sachse *et al.*, 2009). Una vez en el laboratorio, las muestras fueron congeladas a -20 °C hasta su procesamiento siguiendo el protocolo descrito por Mora *et al.* (2015). En el caso de los machos, las muestras se obtuvieron de prepucio (n=7) y semen (n=3), el cual fue recolectado mediante vagina artificial.

Aislamiento e identificación de *Chlamydia abortus* en cultivo celular

El aislamiento de la bacteria patógena en las muestras evaluadas, así como la propagación de la cepa de referencia *C. abortus* A.22 se realizó dentro de las instalaciones del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria (CENID) Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Para la propagación se utilizaron monoestratos celulares de fibroblastos L929 de ratón, los cuales se cultivaron en botellas de poliestireno de 75 cm². Las células se cultivaron en Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM-C, GIBCO Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) suplementado con 10 % de SFB, 1 % aminoácidos no esenciales, 1 % L-Glutamina y antibióticos (50 µg /mL gentamicina) en condiciones de humedad en incubadora a 37 °C y 5 % de CO₂ (Escalante-Ochoa *et al.*, 1996). Se utilizaron placas de poliestireno de 24 pozos (NUNC™, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), en las cuales se colocaron cubreobjetos de vidrio estériles de 12 mm de diámetro para la identificación de cuerpos clamidiales por inmunofluorescencia. La concentración celular que se empleó fue de 0.9 x 10⁵ células por pozo, dejándose incubar 24 h hasta obtener 80-90 % de confluencia (Mora *et al.*, 2015).

Para el proceso de infección, una vez alcanzada la confluencia de 80-90% se retiró por completo el MEM-C y se agregaron 100 µL por pozo del sobrenadante de las muestras evaluadas. Cada placa contó con un control positivo (cepa *C. abortus* A22) y un testigo negativo, los cuales se incluyeron por duplicado. Las placas se incubaron con las muestras durante 1 h a 37 °C en una incubadora con rotación orbital a 50 rpm, una vez transcurrido ese tiempo se añadieron 900

µL adicionales de MEM-C por pozo y se incubaron a 37 °C en condiciones de humedad y 5 % CO₂ por 72 h. Al concluir el periodo de incubación, se realizó un raspado en los pozos de las placas sin cubreobjetos para obtener el tapete celular, las células junto con el MEM-C se conservaron en microtubos estériles identificados y congelados a -70 °C. A las placas con cubreobjetos se les retiró MEM-C antes de realizar tres lavados de 5 min cada uno con solución salina de fosfatos (PBS). Posteriormente, se retiró el PBS y se fijó la muestra con 1 mL de metanol puro a -20 °C durante 10 min, una vez transcurrido ese tiempo se retiró el metanol y las placas se secaron a temperatura ambiente previo a su congelación a -70 °C.

Determinación de cuerpos de inclusión

Para identificar las inclusiones intracitoplasmáticas producidas por *Chlamydia spp.* se utilizó el kit comercial IMAGEN™ *Chlamydia* Immunofluorescence test (Thermo Scientific, OXOID, UK). La técnica de detección está basada en identificar el lipopolisacárido (LPS) de la bacteria mediante inmunofluorescencia directa al utilizar anticuerpos monoclonales anti-LPS acoplados a FITC. El procedimiento se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante y siguiendo el procedimiento descrito por Vanrompay *et al.* (1994). Finalmente, la visualización y evaluación de las muestras se realizó de acuerdo a un protocolo previamente publicado (Mora *et al.*, 2015).

Identificación de *Chlamydia abortus* mediante PCR

Para identificar a *C. abortus* mediante PCR, se extrajo ADN de las muestras evaluadas. Adicionalmente, se extrajo ADN de fibroblastos infectados con la cepa de referencia (*C. abortus* A22) para ser utilizados como control positivo y ADN de fibroblastos sin infectar para ser utilizado como control negativo. En todos los casos se utilizó el kit comercial QIAamp DNA Mini de la marca QIAGEN de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El cual está diseñado para la rápida purificación de ADN total utilizando la técnica de microcentrifugación. Se emplearon los iniciadores utilizados por Jiménez-Estrada *et al.* (2008): CpaX-1, 5'-ACGGTCACTTG-GAAACAAGG-3'; y CpaX-2, 3'-AGCAGAGTTGGGCTCACTA-5'. Estos iniciadores amplifican un fragmento específico de *C. abortus* de 912 pares de bases del gen de la proteína de membrana externa polimórfica, POMP 90-91-B. El proceso de amplificación inició con 5 min de desnaturalización a 95 °C, seguida de 30 ciclos de amplificación. Cada ciclo consistió en desnaturalización a 95 °C por un minuto, alineación a 60 °C por 30 segundos, extensión a 72 °C por un minuto y extensión final a 72 °C por 10 min. Los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % y visualizados mediante tinción con bromuro de etidio.

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó una prueba de χ^2 a dos colas para comparar la proporción de hembras positivas o negativas al patógeno de acuerdo con su desenlace reproductivo (parto o aborto). Adicionalmente, se realizó un

análisis de componentes principales para visualizar el patrón de asociación entre las variables de las hembras: raza, positividad a *C. abortus*, desenlace reproductivo, edad y número de partos; frente a las características del estudio: positividad a clamidiosis y tiempo de recolección de la muestra. El modelo se construyó utilizando la matriz de covarianza de las variables (Aguirre-Benítez *et al.*, 2017, Pacheco-Velázquez *et al.*, 2019). Finalmente, en las hembras del estudio en seguimiento se realizó un análisis de regresión logística binaria para determinar si la presencia del patógeno (muestras positivas mediante aislamiento) se predice en función de alguna de las siguientes variables categóricas: raza, Nubia o Boer; período de evaluación, primer o segundo período; desenlace reproductivo, parto o aborto; edad, <3, 4-6 o >7 años; período de recolección de la muestra, <6 o >7 días; número de partos, <5, 6-8 o >9 partos. Para resumir los resultados se utilizó la razón de momios (Odds Ratio, OR), el cual en caso de resultar <1 se presentó con su recíproco (1/OR) (Romo-Barron *et al.*, 2019).

Todos los análisis se realizaron en el paquete estadístico SAS University Edition (SAS Institute, Cary, NC, USA). En todos los casos se consideró un valor de $p < 0.05$ como significativo. Las figuras se construyeron en el paquete estadístico Prism 8.0 (GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primera etapa: estudio de prevalencia

En el estudio se encontró una prevalencia de clamidiosis del 55.6% en las hembras debido a que se detectó *C. abortus* mediante aislamiento en 75/135 muestras evaluadas (Tabla 1). De las muestras positivas, 92.0 % (69/75) se encontraron en cabras que tuvieron parto normal, mientras que el resto fue encontrado en hembras que presentaron aborto. De las cabras que tuvieron parto normal 55.2 % (69/125) resultaron positivas y 60 % (6/10) de las cabras que tuvieron aborto fueron detectadas como positivas a *C. abortus*. Por lo tanto, la prevalencia de clamidiosis fue similar ($p > 0.05$) entre los dos grupos de cabras. Adicionalmente, las 75 muestras que resultaron positivas mediante aislamiento se utilizaron para

Tabla 1. Resultados del estudio de prevalencia mediante cultivo y aislamiento de *Chlamydia abortus* en un rebaño caprino con problemas de aborto en la zona centro de Sinaloa, México.

Table 1. Microbiological results from the cross-sectional study to assess the prevalence of *Chlamydia abortus* in caprine goats with abortion issues in Central Sinaloa, Mexico.

Técnica	Desenlace	Resultado		Total ^a
		Positiva	Negativa	
Aislamiento	Parto	69	56	125
	Aborto	6	4	10
		75 (55.6%)	60 (44.4%)	135

^a La detección de *C. abortus* se realizó mediante aislamiento en cultivo bacteriano. Se incluyeron 135/250 hembras del total del rebaño caprino, las cuales se seleccionaron debido a que presentaron parto o aborto reciente (<30 días).

^a *C. abortus* was detected by bacterial culture. In total, 135/250 goats from the herd were included in the study based on recent (<30 days) kidding or abortion.

confirmar la presencia de la bacteria mediante PCR (Figura 1). Los resultados indicaron que en 13.3 % de las muestras (10/75) se detectó molecularmente la presencia de *C. abortus* (Tabla 2). A pesar de la baja concordancia entre los métodos, se confirmó la presencia del patógeno mediante PCR en 83.3 % (5/6) de las hembras que abortaron y que fueron detectadas como positivas mediante aislamiento. En contraste, la confirmación molecular de clamidiosis resultó menor en las cabras que tuvieron parto normal y que resultaron positivas mediante aislamiento (7.8 %, 5/64; $p < 0.05$). Es posible que la diferencia en el número de detecciones positivas por PCR se asocie con una menor disponibilidad de material genético debido a la disminución de la carga bacteriana de las muestras evaluadas, la cual se sabe que es mayor durante el parto o el aborto de las hembras infectadas (Longbottom y Coulter, 2003). En nuestro estudio, en algunos casos se obtuvieron las muestras hasta 30 días posteriores al evento de parto/aborto, con lo cual la excreción de bacterias pudo haber disminuido significativamente hasta generar una detección negativa por PCR (World Organization for Animal Health (OIE), 2018). No obstante, se requieren más estudios para evaluar la asociación entre el tiempo de muestreo y el resultado de diagnóstico molecular de la bacteria.

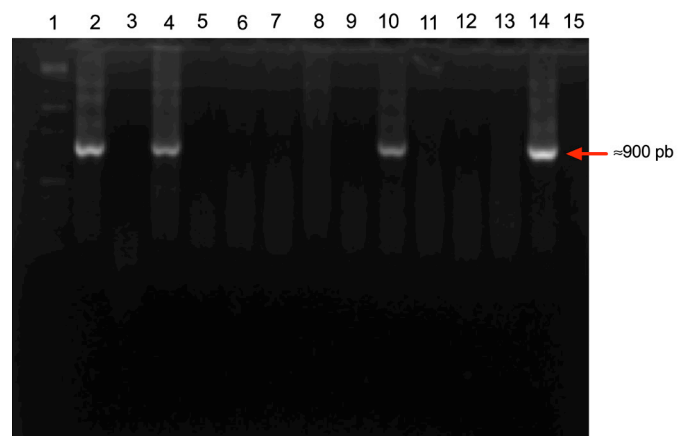


Figura 1. Imagen representativa de la identificación del producto de 912 pb correspondientes al gen de la proteína POMP 90-91-B de *C. abortus* en muestras provenientes de hembras positivas a clamidiosis mediante aislamiento. El tamaño de los productos de las muestras identificadas se presenta a la derecha. Carriles: 1) marcador de peso molecular, 2) control positivo, 3) control negativo, 4-15) muestras evaluadas.

Figure 1. Representative image of the 912 bp identification product corresponding to the *C. abortus* POMP 90-91-B protein-encoding gene, found in samples from positive goats detected by bacterial isolation. The right side shows the relative size of the identified product. Lines: 1) molecular weight standards, 2) positive control, 3) negative control, 4-15) assessed samples.

Tabla 2. Resultados de la confirmación por PCR de la presencia de *Chlamydia abortus* en 75 muestras positivas identificadas mediante aislamiento.

Table 2. PCR confirmatory results for the presence of *Chlamydia abortus* in the 75 positive samples identified by bacterial isolation.

Desenlace	Resultado		Total ^a	
	Positiva	Negativa		
Parto	5	64	69	
Aborto	5	1	6	
		10 (13.3%)	65 (86.7%)	75

A pesar de la discrepancia entre los métodos evaluados, las técnicas moleculares (PCR convencional o PCR en tiempo real) se consideran el método recomendado para la confirmación de casos clínicos de clamidiosis, así como para los estudios de vigilancia epidemiológica (World Organization for Animal Health (OIE), 2018). No obstante, tanto el aislamiento como el PCR se consideran técnicas complementarias de diagnóstico, las cuales además deben corroborarse mediante análisis patológico para incrementar la precisión del diagnóstico (Borel *et al.*, 2018).

Nuestros resultados demuestran por primera vez la presencia de *C. abortus* en cabras con problemas de aborto en la región centro del estado de Sinaloa. De esta forma, la detección de clamidiosis en Sinaloa amplía la distribución espacial de *C. abortus* dentro del territorio de México. Sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha han evaluado la presencia de *C. abortus* en una cantidad muy reducida de estados, por lo cual es muy probable que se subestime la prevalencia real de la clamidiosis a nivel nacional.

En lo referente a ganado caprino, Campos-Hernandez *et al.* (2014) y Mora *et al.* (2015) reportaron prevalencias de 4.8 % y 23.8 % en Guanajuato, respectivamente. Mientras que en Querétaro se ha reportado una alta prevalencia de clamidiosis de entre 71.4 % y 100.0 % (Escalante-Ochoa *et al.*, 1997, Sánchez-Rocha, 2014). Por otra parte, Sánchez-Rocha (2014) reportaron una prevalencia heterogénea de 0.0 % hasta 28.0 % en hatos de Veracruz, Jalisco, Coahuila, Puebla. En ovinos, Jiménez-Estrada *et al.* (2008) reportó la presencia de *C. abortus* en rebaños del estado de México en donde encontró una prevalencia de 22.6 %, mientras que Escalante-Ochoa *et al.* (1996) evaluaron la presencia de clamidiosis en cinco regiones del altiplano mexicano, en los cuales encontraron una prevalencia conjunta de 92.8 %. Adicionalmente, en un estudio reciente realizado en los estados de Tlaxcala, Sonora, Chihuahua, Hidalgo, Chiapas, Querétaro y Estado de México, se encontró una prevalencia de *C. abortus* a nivel de muestra individual de entre 7.1 % y 13.1 % (Reséndiz *et al.*, 2020).

La existencia de un mayor número de estados del país que presentan clamidiosis en los rebaños de pequeños rumiantes sigue la dinámica actual mundial, de acuerdo con la cual en años recientes se ha incrementado el número de países y regiones en los cuales se ha detectado *C. abortus*. Por ejemplo, en Argentina (Di Paolo *et al.*, 2019, Rojas *et al.*, 2018), China (Hu *et al.*, 2018), Croacia (Spicic *et al.*, 2015), Costa Rica (Villagra-Blanco *et al.*, 2015), España (Tejedor-Junco *et al.*, 2019), Irán (Esmaili *et al.*, 2015, Heidari *et al.*, 2018) y Palestina (Jalboush *et al.*, 2017), entre otros.

Con respecto a la identificación de *C. abortus* en los machos evaluados, 2/7 muestras de hisopado prepucial y 1/3 muestras de semen resultaron positivas al patógeno. Los resultados obtenidos concuerdan con el trabajo realizado por Teankum *et al.* (2007) en donde se demuestra la presencia *C. abortus* en semen de caprinos. Jalboush *et al.* (2017) recientemente reportaron que en 53.3 % de las granjas ovinas que evaluaron en su estudio encontraron un macho seropositivo sexualmente activo. Además, a nivel individual en 2,608

machos analizados, encontraron una prevalencia de 13.7 % a *C. abortus*, con lo cual sugieren un problema potencial de transmisión venérea (Jalboush *et al.*, 2017). Nuestros resultados confirman que en el rebaño caprino evaluado el uso de machos infectados con clamidiosis se debe de considerar un factor de riesgo para la transmisión de la enfermedad por vía sexual hacia las hembras sanas del rebaño. En consecuencia, debido a que la presencia de machos infectados supone un riesgo para mantener e incrementar la prevalencia de clamidiosis, es necesario que en México se apliquen las medidas recomendadas por la Organización Mundial de Salud Animal (World Organization for Animal Health (OIE), 2019) para la importación de semen de pequeños rumiantes y así evitar la diseminación de la infección por esta vía.

Nuestros resultados representan el primer reporte de *C. abortus* en caprinos en el estado de Sinaloa, por lo cual se recomienda realizar más estudios de vigilancia epidemiológica a nivel estatal para determinar con mayor precisión la prevalencia de clamidiosis dentro del rebaño caprino de Sinaloa. Es posible que en el estado de Sinaloa existan rebaños de caprinos con características similares al que aquí se evaluó, dentro de los cuales al menos una parte de los problemas de aborto se deban a la clamidiosis. No obstante, la falta de pruebas diagnósticas accesibles aunado al desconocimiento de los productores pueden ocultar la prevalencia real de la enfermedad. Es por ello necesario el estudio de la bacteria para poder implementar medidas sanitarias de control y buen manejo sanitario contra la clamidiosis, tal como lo describen las guías de la Organización Mundial de Sanidad Animal (World Organization for Animal Health (OIE), 2019) para la importación de semovientes, embriones o semen con fines reproductivos. De hecho, estas prácticas se deberían de extender dentro de los estados para evitar la propagación de la enfermedad hacia hatos sanos. A pesar de que en diferentes regiones del mundo se utiliza la vacunación como uno de los métodos más eficaces de control de la clamidiosis (Longbottom y Livingstone, 2006, Zhou *et al.*, 2018), en nuestro país no se utiliza dicha medida profiláctica. En consecuencia, sería útil evaluar en futuros estudios el efecto protector que confiere la vacunación en rebaños con alto riesgo de contagio.

Segunda etapa: estudio de seguimiento

Los resultados del estudio de seguimiento demostraron un incremento significativo en la prevalencia de *C. abortus* en las 32 cabras que fueron evaluadas durante dos períodos de partos consecutivos. En este grupo seleccionado de cabras, el número de hembras positivas se incrementó de 2 a 17 y con ello la prevalencia pasó de 6.3 % a 53.1 % entre los períodos. No obstante, a pesar del incremento sustancial en el número de aislamientos positivos, el número de abortos en las 32 cabras disminuyó al pasar de 5 a 2 entre ambos períodos. Sin embargo, la positividad al patógeno se incrementó entre las hembras que abortaron; todas las hembras que abortaron durante el primer período resultaron negativas a *C. abortus*, mientras que durante el segundo período

de evaluación las dos hembras que abortaron resultaron positivas (Tabla 3).

En un estudio reciente de Reséndiz *et al.* (2020) en el cual se evaluaron factores de riesgo asociados a la presencia de clamidiosis en ovinos, los autores reportaron que los sistemas de producción de tipo intensivo y semi-intensivo favorecieron significativamente la presencia de *C. abortus* con respecto a los sistemas extensivos. En este sentido, se ha encontrado que el contacto entre animales sanos y enfermos en los sistemas intensivos y semi-intensivos acelera la propagación de la bacteria patógena debido al hacinamiento al que son sujetos los animales en estos sistemas de producción (Barkallah *et al.*, 2018, Heidari *et al.*, 2018). De acuerdo con dicha evidencia, es posible que el incremento de la positividad a *C. abortus* que observamos entre los dos períodos de seguimiento se asocie parcialmente con el hecho de que las hembras evaluadas en los dos períodos compartieron el corral de parto con el resto de las hembras del rebaño; entre las cuales se existieron hembras que abortaron y que resultaron positivas al patógeno. No obstante, es necesario realizar estudios adicionales que evalúen la asociación entre la positividad a clamidiosis y el tipo de manejo que reciben los animales en los sistemas de producción caprina de la región. Adicionalmente, dos ejemplares machos que realizaron empadre con este grupo de cabras resultaron positivos a clamidiosis; en consecuencia, no se descarta que los machos sean una fuente importante para diseminar la enfermedad por vía sexual como se ha demostrado previamente (Teankum *et al.*, 2007).

Si tomamos en cuenta que una elevada carga bacteriana es excretada en fluidos vaginales, placenta y en el recién nacido durante el parto o en el feto durante el aborto (Van den Brom *et al.*, 2012), entonces es posible sugerir que las condiciones en las que se alojan a las cabras durante las épocas de parto en los sistemas productivos de México influyen de forma importante en la diseminación de la enfermedad. Lo anterior debido a que las hembras sanas y las infectadas comparten las instalaciones. Adicionalmente, el potencial infeccioso de *C. abortus* se incrementa por la contaminación

Tabla 3. Resultados del estudio longitudinal de 32 hembras durante dos períodos consecutivos de partos.

Table 3. Results from the longitudinal study of 32 goats during two consecutive kidding periods.

Período de seguimiento	Desenlace	Positiva	Negativa	Total ^a
Primero	Parto	2	25	27
	Aborto	0	5	5
		2 (6.3%)	30 (93.7%)	32
Segundo	Parto	15	15	30
	Aborto	2	0	2
		17 (53.1%)	15 (46.9%)	32

^a Se seleccionaron y siguieron durante dos épocas de parto a 32/135 hembras positivas mediante aislamiento que se detectaron en el estudio transversal.

^a From the original 135 positive goats detected by bacterial isolation, 32 goats were selected and followed during two kidding periods.

del medio ambiente mediante las descargas bacterianas de las hembras infectadas, con lo cual aumenta el riesgo de que las cabras sanas adquieren la bacteria por vía oral en el alimento o en el agua (Papp *et al.*, 1993).

En la Figura 2A se presenta el patrón de asociación entre las variables incluidas en el análisis de componentes principales. La edad y el número de partos de las cabras

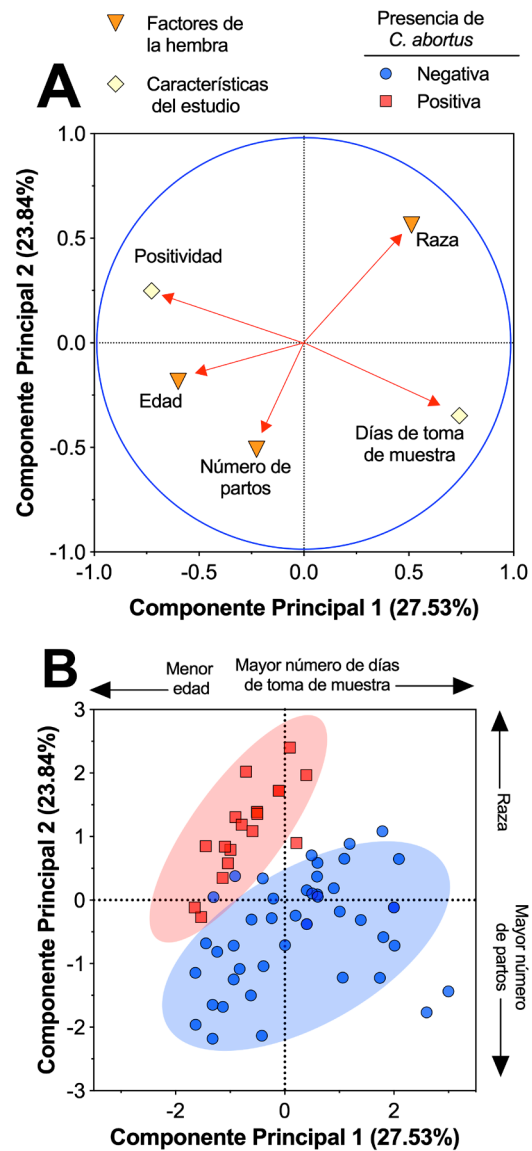


Figura 2. Patrón de asociación entre las características de las hembras evaluadas durante el estudio longitudinal y el resultado de clamidiosis. A) Valores de carga de las variables dentro de los dos componentes principales, los cuales explican 51.4% de la variación total; B) Puntuaciones individuales de las cabras evaluadas durante los dos períodos de seguimiento, las cabras se clasificaron de acuerdo con la presencia de *C. abortus*. La edad y el número de partos contribuyeron a la separación de los animales infectados de aquellos sanos.

Figure 2. Association pattern between the characteristics of goats evaluated in the longitudinal study, and the chlamydia test result. A) Loading values for the outcomes in the two main principal components, which explain 51.4% of the total variance; B) Individual scores for the goats during two kidding periods, females were categorized according to the presence of *C. abortus*. The goats age and the number of kidding contributed to the groups separation between infected and healthy animals.

contribuyeron a la separación de las hembras que resultaron positivas con respecto a las negativas. En particular, las hembras positivas se asociaron con una menor edad y un menor número de partos, con lo cual se infiere que las hembras del rebaño que principalmente son afectadas por la clamidiosis tienden a ser hembras jóvenes con un número reducido de partos. Nuestro patrón de asociación contrastó con un estudio previo realizado en ovinos, en el cual se encontró que el grupo de hembras de entre 37 y 48 meses de edad presentó un incremento significativo de la probabilidad de resultar positivas a clamidiosis (Reséndiz *et al.*, 2020). En la Figura 2B se aprecia que aquellas hembras que resultaron negativas se separan por presentar un mayor número de partos. Además, también se encontró una asociación entre un mayor número de días en la toma de la muestra y el resultado negativo en las hembras. En este sentido, el intervalo de tiempo entre el evento de parto/aborto y la toma de muestra es importante para asegurar un diagnóstico apropiado mediante aislamiento, lo anterior debido a que se pueden producir diagnósticos falsos negativos a causa de la reducción de la carga bacteriana que expulsan las cabras afectadas (Longbottom y Coulter, 2003).

En la Figura 3 se resumen los resultados del análisis de regresión logística que se utilizó para modelar la asociación entre el aislamiento positivo a *C. abortus* y las variables categóricas. Únicamente el período de evaluación resultó

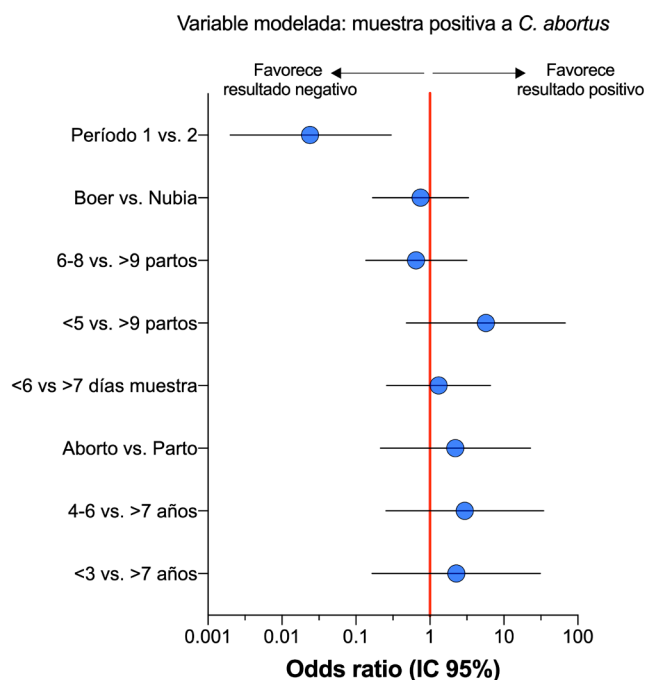


Figura 3. Valores estimados de odds ratio obtenidos mediante análisis de regresión logística binaria en las 32 hembras evaluadas durante dos períodos de seguimiento. Se muestran los valores estimados y el intervalo de confianza al 95% (IC 95%) tomando en cuenta como variable de modelado el resultado positivo de *C. abortus*.

Figure 3. Odds ratio values found by binary logistic regression analysis in the 32 goats included in the longitudinal study, throughout two kidding periods. Values and 95% confidence intervals are plotted taking a positive result for *C. abortus* as the modelling outcome.

significativo dentro del modelo ya que la evaluación durante el primer período favoreció un resultado negativo del aislamiento. En consecuencia, durante el segundo período de seguimiento se incrementó en 41.6 veces la posibilidad (OR=0.024, IC 95%: 0.002 a 0.299) de que las hembras tuvieran un diagnóstico positivo de clamidiosis con respecto al primer período. Dicho resultado pone de manifiesto la capacidad infecciosa de la bacteria, ya que el número de cabras positivas pasó de 2 a 17 en tan solo dos épocas consecutivas de partos.

CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación evidencian la presencia de *C. abortus* en caprinos con problemas de aborto dentro de la región centro del estado de Sinaloa. La prevalencia encontrada en el presente estudio fue superior al promedio nacional y a los valores encontrados en rebaños caprinos evaluados en otros estados. Ambos resultados sugieren la importancia de realizar estudios epidemiológicos dentro de las zonas caprinas del estado de Sinaloa, para así tener un panorama más completo y preciso de la magnitud de la infección causada por *C. abortus*. Además, nuestros resultados también demostraron que los machos infectados pueden ser un factor de riesgo para diseminar la infección de forma venérea. Por otro lado, el incremento observado en la prevalencia de clamidiosis en el estudio de seguimiento sugiere que, en caso de no establecer medidas eficientes de detección y control de la enfermedad, la magnitud de la enfermedad puede incrementarse y con ello generar una mayor afectación en la salud y productividad de los animales infectados. Por ello es necesario implementar medidas para reducir la diseminación de la bacteria en los rebaños caprinos para así disminuir las pérdidas ocasionadas por los abortos.

AGRADECIMIENTOS

R. Castro-Flores es alumna de Doctorado del Posgrado del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa y realizó este estudio como requisito parcial para obtener su grado de Doctora en Ciencias. Este estudio fue financiado con el proyecto SAGARPA CONACYT 2017-2-291311: "Desarrollo y transferencia de pruebas diagnósticas para Lentivirus y microorganismos causantes de aborto: *Chlamydia* spp, *Brucella melitensis*, *Leptospira* spp y *Coxiella burnetii*, en ovinos y caprinos".

REFERENCIAS

- Aguirre-Benítez, E.L., Porras, M.G., Parra, L., González-Ríos, J., Garduño-Torres, D.F., Albores-García, D., *et al.* 2017. Disruption of behavior and brain metabolism in artificially reared rats. *Developmental Neurobiology*, 77, 1413-1429.
- Aitken, I. y Longbottom, D. 2007. Chlamydial abortion. In: AITKEN, I. (ed.) *Diseases of sheep*. 4th ed. United Kingdom: Blackwell Publishing.
- Amin, J. y Wilsmore, A. 1995. Studies on the early phase of the pathogenesis of ovine enzootic abortion in the non-pregnant ewe. *British Veterinary Journal*, 151, 141-155.

- Barkallah, M., Jribi, H., Ben Slima, A., Gharbi, Y., Mallek, Z., Gautier, M., *et al*. 2018. Molecular prevalence of Chlamydia and Chlamydia-like bacteria in Tunisian domestic ruminant farms and their influencing risk factors. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, e329-e338.
- Borel, N., Polkinghorne, A. y Pospischil, A. 2018. A Review on Chlamydial Diseases in Animals: Still a Challenge for Pathologists? *Veterinary Pathology*, 55, 374-390.
- Campos-Hernandez, E., Vazquez-Chagoyan, J.C., Salem, A.Z., Saltijeral-Oaxaca, J.A., Escalante-Ochoa, C., Lopez-Heydeck, S.M., *et al*. 2014. Prevalence and molecular identification of *Chlamydia abortus* in commercial dairy goat farms in a hot region in Mexico. *Trop Anim Health Prod*, 46, 919-24.
- Cheong, H.C., Lee, C.Y.Q., Cheok, Y.Y., Tan, G.M.Y., Looi, C.Y. y Wong, W.F. 2019. Chlamydiaceae: Diseases in Primary Hosts and Zoonosis. *Microorganisms*, 7.
- Di Paolo, L.A., Alvarado Pinedo, M.F., Origlia, J., Fernandez, G., Uzal, F.A. y Traveria, G.E. 2019. First report of caprine abortions due to *Chlamydia abortus* in Argentina. *Veterinary Medicine and Science*, 5, 162-167.
- Diaz, D., Rosiles, R.J., Urias-Castro, C.J., Rodriguez-Gaxiola, M.A., Gaxiola, S.M. y Montero-Pardo, A. 2019. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of reproductive management practices used to induce resumption of ovarian cyclical activity in anestrus does. *Prev Vet Med*, 169, 104709.
- Donis, J.H. 2013. Tipos de diseños de los estudios clínicos y epidemiológicos. *Avances en biomedicina*, 2, 76-99.
- Entrican, G., Buxton, D. y Longbottom, D. 2001. Chlamydial infection in sheep: immune control versus fetal pathology. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 94, 273-277.
- Escalante-Ochoa, C., Diaz-Aparicio, E., Segundo-Zaragoza, C. y Suarez-Guemes, F. 1997. Isolation of *Chlamydia psittaci* involved in abortion of goats in Mexico: first report. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 39, 117-122.
- Escalante-Ochoa, C., Rivera-Flores, A., Trigo-Tavera, F. y Romero-Martinez, J. 1996. Detection of *Chlamydia psittaci* in enteric subclinical infections in adult sheep, through cell culture isolation. *Revista latinoamericana de microbiología*, 38, 17-23.
- Esmaeili, H., Bolourchi, M. y Mokhber-Dezfouli, M.R. 2015. Seroprevalence of *Chlamydia abortus* infection in sheep and goats in Iran. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 9, 73-77.
- Heidari, S., Derakhshandeh, A., Firouzi, R., Ansari-Lari, M., Masoudian, M. y Eraghi, V. 2018. Molecular detection of *Chlamydia abortus*, *Coxiella burnetii*, and *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants' aborted fetuses in southern Iran. *Trop Anim Health Prod*, 50, 779-785.
- Honhold, N., Petit, H. y Halliwell, R. 1989. Condition scoring scheme for small East African goats in Zimbabwe. *Tropical animal health and production*, 21, 121-127.
- Hu, S.F., Li, F., Zheng, W.B. y Liu, G.H. 2018. Seroprevalence and Risk Factors of *Chlamydia abortus* Infection in Goats in Hunan Province, Subtropical China. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 18, 500-503.
- Jalboush, N., Atalla, H. y Alzuheir, I. 2017. Detection of *Chlamydia abortus* antibody in active reproductive rams in sheep herds in northern Palestine. *Revue de Medecine Veterinaire*, 168, 192-196.
- Jiménez-Estrada, J.M., Escobedo-Guerra, M.R., Arteaga-Troncoso, G., López-Hurtado, M., Haro-Cruz, M.D., Jiménez, R.M., *et al*. 2008. Detection of *Chlamydia abortus* in sheep (*Ovis aries*) in Mexico. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*.
- Kuo, C. y Stephens, R. 2011. Family I. Chlamydiaceae. In: KRIEG, N., STALEY, J., BROWN, D., HEDLUND, B., PASTER, B., WARD, N., LUDWIG, W. & WHITMAN, W. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2 ed. New York, USA: Springer.
- Livingstone, M., Wheelhouse, N., Maley, S.W. y Longbottom, D. 2009. Molecular detection of *Chlamydia abortus* in post-abortion sheep at oestrus and subsequent lambing. *Veterinary Microbiology*, 135, 134-41.
- Longbottom, D. 2004. Chlamydial infections of domestic ruminants and swine: new nomenclature and new knowledge. *The Vet J*, 168, 9-11.
- Longbottom, D. y Coulter, L. 2003. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J Com Pathology*, 128, 217-244.
- Longbottom, D. y Livingstone, M. 2006. Vaccination against chlamydial infections of man and animals. *Veterinary Journal*, 171, 263-75.
- Mora, J.C., Diaz, E., Herrera, E., Suárez-Güemez, F., Escalante, C., Jaimes, S., *et al*. 2015. Aislamiento de *Chlamydia abortus* en rebaños caprinos lecheros y su relación con casos de aborto en Guanajuato, México. *Veterinaria México*, 2.
- Nietfeld, J.C. 2001. Chlamydial infections in small ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 17, 301-314.
- Norma Oficial Mexicana Nom-062-Zoo-1999. 2001. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [Consultado 20 Abril 2020]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf.
- Organización Mundial De La Salud 2002. CIOMS, Pautas éticas internacionales para la Investigación Biomédica involucrando seres humanos. Ginebra, Suiza: Organización Mundial de la Salud.
- Pacheco-Velázquez, S.C., Gallardo-Pérez, J.C., Díaz, D., Adán-Ladrón De Guevara, A., Robledo-Cadena, D.X., Saavedra, E., *et al*. 2019. Heart myxoma develops oncogenic and metastatic phenotype. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 145, 1283-1295.
- Papp, J.R., Shewen, P.E. y Gartley, C.J. 1993. *Chlamydia psittaci* infection and associated infertility in sheep. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 57, 185.
- Reséndiz, E.G.P., Sánchez, P.M., Romero, F.A., De La Cruz Colín, L., Severiano, H.J., Corona, J.C.L., *et al*. 2020. Frecuencia y factores de riesgo asociados a la presencia de *Chlamydia abortus*, en rebaños ovinos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11, 783-794.
- Rodolakis, A. y Souriau, A. 1986. Response of goats to vaccination with temperature-sensitive mutants of *Chlamydia psittaci* obtained by nitrosoguanidine mutagenesis. *Am J Vet Res*, 47, 2627-31.
- Rodolakis, A. y Yousef Mohamad, K. 2010. Zoonotic potential of *Chlamydia abortus*. *Vet Microbiology*, 140, 382-91.
- Rojas, M.D.C., Fort, M., Bettermann, S., Entrocassi, C., Costamagna, S.R., Sachse, K., *et al*. 2018. [Detection of *Chlamydia abortus* in bovine reproductive losses in the province of La Pampa, Argentina]. *Revista Argentina de Microbiología*, 50, 269-274.

- Romo-Barron, C.B., Diaz, D., Portillo-Loera, J.J., Romo-Rubio, J.A., Jimenez-Trejo, F. y Montero-Pardo, A. 2019. Impact of heat stress on the reproductive performance and physiology of ewes: a systematic review and meta-analyses. *Int J of Biomet*, 63, 949-962.
- Sachse, K., Vretou, E., Livingstone, M., Borel, N., Pospischil, A. y Longbottom, D. 2009. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Veterinary Microbiology*, 135, 2-21.
- Sánchez-Rocha, L. 2014. Presencia de *Chlamydia abortus* en cabras de México. M. en C., Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Secretaría De Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca Y Alimentación 2016. Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos. México: Diario Oficial.
- Servicio De Información Agroalimentaria Y Pesquera. 2020. Población Ganadera Caprina 2010-2019. México: SAGARPA. [Consultado 20 Octubre 2020]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/564339/Inventario_2019_caprino.pdf.
- Soriano-Vargas, E., Jiménez-Estrada, J.M., Salgado-Miranda, C., López-Hurtado, M., Escobedo-Guerra, M.R. y Guerra-Infante, F.M. 2011. Identificación de *Chlamydia abortus* en un aborto ovino en Almoloya de Juárez, México. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 12, 1-6.
- Spicic, S., Racić, I., Andrijanic, M., Duvnjak, S., Zdelar-Tuk, M., Stepanic, M., *et al*. 2015. Emerging cases of chlamydial abortion in sheep and goats in Croatia and Bosnia and Herzegovina. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 128, 188-187.
- Teankum, K., Pospischil, A., Janett, F., Brugnera, E., Hoelzle, L.E., Hoelzle, K., *et al*. 2007. Prevalence of chlamydiae in semen and genital tracts of bulls, rams and bucks. *Theriogenology*, 67, 303-10.
- Tejedor-Junco, M.T., Gonzalez-Martin, M., Corbera, J.A., Santana, A., Hernandez, C.N. y Gutierrez, C. 2019. Preliminary evidence of the seroprevalence and risk factors associated with *Chlamydia abortus* infection in goats on the Canary Islands, Spain. *Tropical Animal Health and Production*, 51, 257-260.
- Tovar Luna, I. 2009. Goat production in Mexico. Overview of the industry and its production practices. Proceedings of the 24th Annual Goat Field Day. Oklahoma, Langston University.
- Van Den Brom, R., Lievaart-Peterson, K., Luttikholt, S., Peperkamp, K., Wouda, W. y Vellema, P. 2012. Abortion in small ruminants in the Netherlands between 2006 and 2011. *Tijdschrift voor diergeneeskunde*, 137, 450-457.
- Vanrompay, D., Van Nerom, A., Ducatelle, R. y Haesebrouck, F. 1994. Evaluation of five immunoassays for detection of *Chlamydia psittaci* in cloacal and conjunctival specimens from turkeys. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 1470-1474.
- Villagra-Blanco, R., Dolz, G., Montero-Caballero, D. y Romero-Zuñiga, J. 2015. Detection of antibodies against *Chlamydia abortus* in Costa Rican sheep flocks. *Open Veterinary Journal*, 5, 122-126.
- World Organization for Animal Health (Oie). 2018. Enzootic Abortion of Ewes (Ovine Chlamydiosis) (infection with *Chlamydia abortus*). OIE. [Consultado 10 Marzo 2020]. Disponible en: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.07.05_ENZ_ABOR.pdf.
- World Organization for Animal Health (Oie). 2019. Infection with *Chlamydia abortus* (Enzootic Abortion of Ewes, Ovine Chlamydiosis). OIE. [Consultado 8 Marzo 2020]. Disponible en: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_chlamydia_abortus.pdf.
- Zhou, J., Li, Z., Lou, Z. y Fei, Y. 2018. Prevalence, Diagnosis, and Vaccination Situation of Animal Chlamydiosis in China. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 88.



Identificación molecular y evaluación de bacterias en el desarrollo vegetativo y producción de chile habanero

Molecular identification and evaluation of bacteria in the vegetative development and production of habanero pepper

Jacel Adame-García¹, Félix David Murillo-Cuevas^{1*}, Felipe Roberto Flores-de la Rosa², Víctor Velázquez-Mendoza¹, Mario López-Vázquez¹, Héctor Cabrera-Mireles³, Efraín Antonio-Vázquez¹

¹ Tecnológico Nacional de México/IT Úrsulo Galván. Km 4.5 Carretera Cd. Cardel-Chachalacas, CP. 91667. Úrsulo Galván, Veracruz, México.

² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. CIRGOC, Campo Experimental Ixtacuaco. Carretera Federal Martínez de la Torre-Tlapacoyan, Ver. km 4.5. Congregación Rojo Gómez, Tlapacoyan, Veracruz, CP. 93650, México.

³ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, CIRGOC, Campo Experimental Cotaxtla, Carretera Federal Veracruz-Córdoba, km. 34.5. Medellín de Bravo, Veracruz, México. CP. 94992, México.

RESUMEN

La producción de chile habanero se realiza con fertilización química, lo cual contamina el suelo y los mantos acuíferos. Esto ha motivado la búsqueda de alternativas sostenibles como las bacterias promotoras de crecimiento. El objetivo de esta investigación fue aislar bacterias promotoras del crecimiento, identificarlas molecularmente y evaluar sus efectos en el desarrollo vegetativo y producción de chile habanero. Se aislaron e identificaron cinco cepas bacterianas a partir de muestras de distintos usos de suelo; el sistema agroforestal registró en promedio la mayor cantidad (3.5×10^5 UFC g^{-1}) de cepas bacterianas. El análisis del gen ADN ribosomal 16S indicó que las bacterias se asocian a diferentes especies del género *Bacillus*, sin embargo, el estudio filogenético demostró que no es posible aún identificarlas a nivel de especie; estas cepas estimularon el crecimiento de las plántulas (6.86, 6.70 y 6.76 cm respectivamente). En la evaluación en macrotúnel, la cepa EAV2 fue la que estimuló el desarrollo de plantas (38.63 cm) y mejor peso de frutos (6.45 g).

Palabras claves: *Bacillus*, biofertilizantes, hortalizas.

ABSTRACT

The production of habanero pepper includes the use of chemical fertilization, which contaminates the soil and aquifer mantles. This environmental damage has motivated the search for sustainable alternatives such as growth-promoting bacteria. This research aimed to isolate growth-promoting bacteria, identify them molecularly, and evaluate their effects on the vegetative development and production of habanero pepper. Five bacterial strains were isolated and identified from samples from different land uses; the agroforestry system recorded on average the most significant amount (3.5×10^5 CFU g^{-1}) of bacterial strains. Analysis of the 16S ribosomal DNA gene indicated that the bacteria were associated with species belonging to the *Bacillus* genus; however, the phylogenetic study shows that the identification at a species level is not possible; these strains stimulated better the seedlings growth (6.86, 6.70 and 6.76 cm respectively).

In the macro tunnel greenhouse evaluation, the EAV2 strain best stimulated the development of plants (38.63 cm) and produced better fruit weight (6.45 g).

Keywords: *Bacillus*, biofertilizers, vegetables.

INTRODUCCIÓN

La producción de hortalizas en México es una de las actividades más importantes en la generación de recursos económicos, además de tener una particular importancia en la agricultura de subsistencia y contribuir en la generación de empleos en el campo (SIAP, 2016). Entre las hortalizas de importancia económica se encuentra el chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), el cual tiene una alta demanda en el mercado nacional e internacional debido a su creciente uso en los alimentos, así como por ser fuente de colorantes naturales y compuestos fitoquímicos benéficos para la salud tales como los capsaicinoides (Ruiz-Bello *et al.*, 2016).

La mayor parte de la producción de chile habanero se realiza con fertilización química (Reyes y Cortez, 2017; Ramírez-Vargas *et al.*, 2019), lo que ha generado un uso excesivo de fertilizantes (Grageda-Cabrera *et al.*, 2012). Por otro lado, el uso intensivo de fertilizantes químicos daña el suelo, contaminan el agua y contribuyen significativamente al cambio climático del planeta (Benbi, 2013). Esto ha motivado la búsqueda de alternativas más sostenibles que permitan una nutrición orgánica, que satisfaga las necesidades del productor y conserven el medio ambiente, como el de la agricultura orgánica, la cual utiliza abonos orgánicos (Luna *et al.*, 2016; Reyes-Pérez *et al.*, 2018; Mendivil-Lugo *et al.*, 2020), bioestimulantes (Torres *et al.*, 2016; Arenas-Julio *et al.*, 2021) y microorganismos (Espinosa-Palomeque *et al.*, 2019; Rodríguez-Hernández *et al.*, 2020) para la fertilización de los cultivos.

Una amplia gama de microorganismos que habitan en el suelo son vitales para las plantas, a través de interacciones benéficas que se desarrollan entre estos (Ríos *et al.*, 2016). Existen antecedentes sobre el crecimiento de las plantas y la estimulación del rendimiento mediante microorganismos

*Autor para correspondencia: Félix David Murillo Cuevas
Correo electrónico: felix.mc@ugalvan.tecnm.mx

Recibido: 11 de abril de 2021

Aceptado: 12 de julio de 2021

benéficos del suelo (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2020). Estos microorganismos desempeñan funciones importantes en el suelo como la fijación biológica de nitrógeno y la solubilización de fosfatos, las cuales son actividades que efectúan mediante enzimas como nitrogenasas y fitasas, con un efecto positivo en la promoción del crecimiento vegetal y en el aumento del potencial productivo (Corrales *et al.*, 2017). Bacterias del género *Bacillus* promueven el crecimiento vegetal a través de la fijación de nitrógeno y como biofertilizantes son una opción amigable al suelo y al ambiente, que dan respuesta a la necesidad de implementar una agricultura sostenible (Corrales *et al.*, 2017; Rodríguez-Hernández *et al.*, 2020). De tal forma que se considera que existen cepas de bacterias en suelos productivos con capacidad promotora del crecimiento vegetal que pueden ser usados como bioestimulantes o biofertilizantes para cultivos de hortalizas. Por lo que el objetivo de este trabajo fue aislar bacterias promotoras del crecimiento vegetal, identificarlas molecularmente y evaluar sus efectos en el desarrollo vegetativo y producción de chile habanero en condiciones protegidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El trabajo se realizó en el Tecnológico Nacional de México, campus Úrsulo Galván (ITUG), ubicado en el municipio de Úrsulo Galván, en la región centro costera de Veracruz. El clima de esta región se clasifica como Aw (tropical húmedo-seco) por el sistema Köppen-Geiger, definido como cálido subhúmedo con lluvias en verano, con un rango de temperatura que oscila entre 24 y 26 °C, y un rango de precipitación entre 1100 y 1300 mm (INAP, 2013).

Obtención de bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Para la obtención de bacterias promotoras del crecimiento vegetal se realizó un muestreo de suelo en los terrenos productivos pertenecientes al ITUG. El muestreo se realizó en la época de lluvias en el mes de agosto, época en la cual se ha registrado mayor abundancia de fauna y microflora edáfica (Murillo-Cuevas *et al.*, 2019). Se tomaron muestras de seis usos de suelo diferentes los cuales fueron: 1) cultivo de limón persa (*Citrus latifolia* Tan.), con un polígono de muestreo de 2.254 ha; 2) cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) variedad ATEMEX 96-40, con un polígono de muestreo de 2.03 ha; 3) cultivo de lichi (*Litchi chinensis* Sonn.), con un polígono de muestreo de 1.535 ha; 4) área con pasto Mombasa (*Panicum maximum* cv. Mombasa), con un polígono de muestreo de 1.584 ha; 5) suelo sin uso agrícola, denominado acahual, con predominancia de las especies Cocuite (*Gliricidia sepium*), Nacastle (*Enterolobium cyclocarpum*), Guácimo (*Guazuma ulmifolia*), Huizache (*Acacia cochliacantha*), Capulín (*Karwinskia humboldtiana*) y Guaje (*Lysiloma divaricatum*); 6) sistema agroforestal que cuenta con cultivos de Morera (*Morus alba*), Colorín (*Erythrina americana*), Bambú (*Bambusa vulgaris*), Guácimo (*Guazuma ulmifolia*), Mulato (*Bursera simaruba*) y Cocuite (*Gliricidia sepium*). Dentro de

cada área de uso de suelo se establecieron dos parcelas de 10 m², dentro de cada parcela se establecieron dos puntos de muestreo de manera aleatoria, en los cuales se utilizó un cuadrante de 25 x 25 cm para determinar el área de la muestra. Las muestras de suelo se tomaron a una profundidad de 0-15 cm, considerada óptima para encontrar mayor abundancia y riqueza de organismos (Franco *et al.*, 2016). Se colectaron un total de cuatro muestras por uso de suelo en dos muestreos.

Para obtener los inóculos se prepararon diluciones (1:9) seriadas (10⁻¹ a 10⁻⁶) en solución fosfatos (0.25 M KH₂PO₄) (NOM-110-SSA-1994), con agitación constante a 120 rpm durante 10 min en un agitador orbital (Lab Line[®]). Se tomó un inóculo de 100 µL y se dispersaron sobre medio de cultivo ELMARC pH 6.8-7.0 (5 g de manitol, 0.2 g extracto de levadura, 0.25 g K₂HPO₄, 0.1 g MgSO₄ 7H₂O, 0.05 g NaCl, 1:400 rojo de Congo, 18 g agar por L de medio). Las cajas se incubaron a 30 °C durante 24 h. La siembra se realizó por triplicado. Una vez seleccionados los microorganismos se inocularon en medio líquido Winogradsky pH 6.5-7.0 [Sacarosa 10 g/L, CaCO₃ 0.1 g/L, Agar 15 g/L, 5 ml Solución mineral (K₂HPO₄ 50 g/L, MgSO₄*7H₂O 25 g/L, NaCl 25 g/L, FeSO₄*7H₂O 1 g/L, NaMoO₄*2H₂O 1 g/L, MnSO₄*4H₂O 1 g/L)] y se incubaron en agitación a 250 rpm durante 76 h.

Identificación molecular de bacterias promotoras del crecimiento vegetal

La extracción de ADN de bacterias se realizó de acuerdo al método de Giraffa *et al.* (2000). El gen ADN ribosomal 16S se amplificó con los iniciadores UnivBactF/UnivBactR (5'-GATCCTGGCTCAGGATGAAC^{3'})/(5'-GGACTACCAGGGTATCTA-ATC^{3'}) en un volumen de reacción de 25 µL (1 X PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA pol, 0.20 mM dNTPs, 15 pM de cada iniciador y ~50–100 ng de ADN genómico). La amplificación se realizó en un termociclador (Mastercycler) bajo el siguiente programa de ciclos térmicos: una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min; seguido de una extensión final a 72°C durante 5 min.

Para la secuenciación, se purificaron los productos de PCR con el kit de purificación ChargeSwitch - Pro PCR Clean-up Kit (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los fragmentos se secuenciaron en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Todas las secuencias se registraron en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) con números de acceso (MW015771-MW015776).

Los datos de secuencias se analizaron en el GenBank mediante el sistema Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Se obtuvieron las secuencias relacionadas mediante BLAST a las secuencias obtenidas de las cepas evaluadas y se alinearon mediante el algoritmo ClustalW (gap open = 15; gap extend = 3) en el software Bioedit, posteriormente se realizó la búsqueda del árbol más parsimonioso mediante algoritmos de búsqueda de nueva tecnología (ratchet+drift+sectorial search) mediante el software TNT. Se realizó un remuestreo

mediante Bootstrap con 999 réplicas. Como grupo externo se utilizó una secuencia 16S de la bacteria *E. coli*.

Evaluación de bacterias en la emergencia, desarrollo y producción de chile habanero

Para la emergencia de plántulas de chile habanero, en charolas con sustrato Peat Moss no estéril, se inocularon con 1 mL de solución bacteriana (10^8 UFC/mL), 100 semillas de chile habanero variedad Jaguar. Las variables de respuesta fueron porcentaje de emergencia, altura de plántula y peso seco de plántulas (65°C durante 72 horas) a los 20 días después de la inoculación (ddi).

Por otra parte, para evaluar el desarrollo y producción de plantas de chile habanero, en estructuras tipo macrotúnel de 3×30 m, forrados con malla antiáfidos y equipado con sistema de riego por goteo, se trasplantaron plántulas en bolsas de 5.5 L volumen con sustrato turba/vermiculita y composta de cachaza de caña de azúcar no estéril (50:50 v/v). Las plántulas se inocularon ocho días después del trasplante con 10 mL de solución bacteriana (10^8 UFC/mL) directamente sobre la raíz. Para la evaluación en plantas de chile habanero las variables fueron altura a los ocho ddi, altura al inicio de la floración y peso del fruto a los 65 ddi.

Análisis de datos y diseño experimental

La evaluación se estableció en un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones por cepa bacteriana, los tratamientos evaluados correspondieron a cada una de las bacterias evaluadas, el testigo consistió en plantas no inoculadas.

Para comparar el efecto de las bacterias promotoras de crecimiento en la emergencia de las plántulas de chile habanero se realizó un análisis no paramétrico de Friedman y para comparar los efectos de las bacterias sobre las variables morfológicas de plántula se realizó un ANOVA y una comparación de medias de Tukey $\alpha=0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Infostat versión 2020.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en diferentes usos de suelo

La abundancia promedio de las cepas bacterianas promotoras de crecimiento en los diferentes usos de suelo fue significativamente diferente. En el suelo del sistema agroforestal se obtuvo en promedio la mayor cantidad de bacterias (3.5×10^5 UFC g^{-1}), mientras que el suelo con pasto fue el que registró la menor abundancia (5×10^4 UFC g^{-1}). El suelo con cultivo de caña de azúcar y limón persa no desarrollaron crecimiento de microorganismos en los medios de cultivo selectivos (Figura 1).

En este caso, Vessey (2003) menciona que las diferencias en cuanto al número de UFC de bacterias de vida libre y su distribución en determinados usos de suelo, están definidos por diversos factores como las características físicas y químicas del suelo, el contenido de materia orgánica, la humedad, la relación carbono nitrógeno y pH, las condiciones climáticas y los exudados de las raíces de las plantas

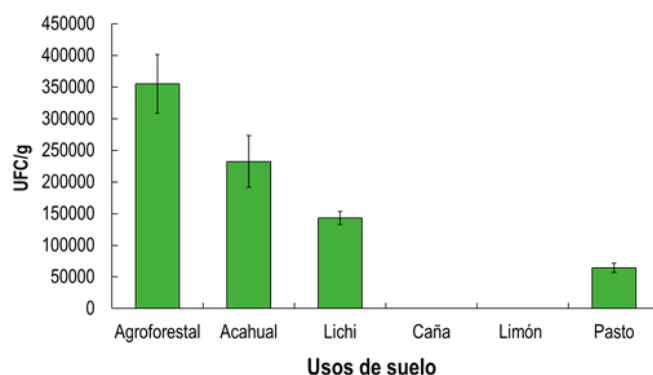


Figura 1. Concentración de bacterias extraídas de suelos con diferente ocupación.

Figure 1. Concentration of bacteria extracted from soils with different occupation.

que sirven de nutrientes para las bacterias; esas condiciones se presentaron en este trabajo al evaluar en diferentes usos de suelo, los cuales cambiaron de acuerdo al cultivo establecido y al manejo proporcionado.

Nuestros resultados, indicaron que los suelos con cultivo de caña de azúcar y limón persa ($<10^1$ UFC g^{-1}) y pasto (5×10^4 UFC g^{-1}) fueron los que presentaron menor recuperación de bacterias con respecto al suelo agroforestal y acahual (3.5×10^5 y 2.2×10^5 UFC g^{-1} , respectivamente), lo cual era de esperarse ya que son sistemas similares entre sí, con diferencias en comparación con los sistemas tradicionales o intensivos agrícolas (Vallejo-Quintero, 2013). No obstante, nuestros resultados difieren con lo reportado por Mantilla-Paredes *et al.* (2009), quienes encontraron una mayor recuperación de aislamientos primarios en suelos de pastizal, seguidos por los sitios con mayor riqueza vegetal como bosques; además, reportan alta presencia de bacterias diazotrofas en el interior y en la superficie de las raíces de varias gramíneas tropicales.

Sin embargo, de acuerdo con Paudel *et al.* (2012) los sistemas agroforestales tienen mayor actividad enzimática y diversidad microbiana en comparación a otros cultivos, debido a diferencias en la cantidad y en la calidad de la materia orgánica y los exudados de las raíces provenientes de los cultivos de cobertura y vegetación permanente. De tal forma que, Kaur *et al.* (2002) reportaron que los sistemas agroforestales incrementan la biomasa microbiana y su actividad, debido a los efectos positivos ejercidos por la incorporación de árboles y los ingresos de materia orgánica.

Identificación molecular de bacterias promotoras de crecimiento vegetal

Los resultados de la amplificación del fragmento 16S rRNA de los aislamientos evaluados generó un producto de ~800 pb (Figura 2). Los resultados obtenidos del análisis BLAST asociaron al género *Bacillus*, esto se resume en el Tabla 1.

El género *Bacillus* pertenece a un grupo de bacterias formadoras de endosporas aeróbicas que abundan en los

Tabla 1. Resultado de análisis BLAST de las secuencias 16S obtenidas de las cepas evaluadas.

Table 1. Results of BLAST analysis of the 16S sequences obtained from the evaluated strains.

Cepa	Especie asociada	Porcentaje de cobertura	e-value	Porcentaje de Identidad	Número de Accesoión NCBI
VVM1	<i>B. megaterium</i>	100%	0.0	97.77%	MT588737.1
EAV2	<i>B. megaterium</i>	99%	0.0	98.44%	MT510154.1
JAG3	<i>B. subtilis</i>	62%	2x10 ⁻¹⁴⁸	91.35%	CP035231.1
FDMC4	<i>B. subtilis</i>	98%	0.0	90.88%	CP035164.1
JVN5	<i>B. simplex</i>	99%	0.0	98.09%	MF767887.1

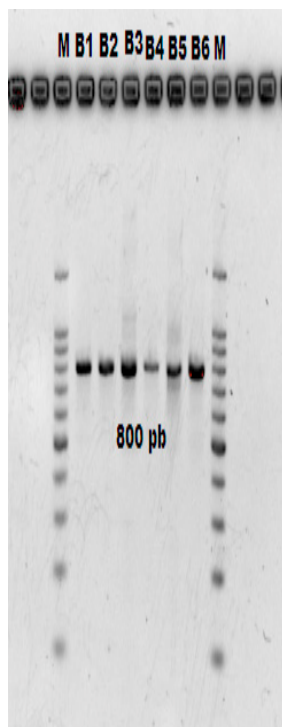


Figura 2. Amplificación del gen 16S de las cinco cepas bacterianas. Cada carril corresponde a una bacteria diferente (B1 a B5) y el carril con letra M corresponde al marcador molecular.

Figure 2. Amplification of the 16S gene of the five bacterial strains. Each lane corresponds to a different bacterium (B1 to B5), and the lane with the letter M corresponds to the molecular marker.

suelos (Subhash *et al.*, 2015) y en la rizosfera (Saharan *et al.*, 2011). Especies como *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. cereus* y *B. pumilus*, pueden ayudar a mejorar el crecimiento y desarrollo de las plantas a través de la producción de compuestos orgánicos, solubilización de fosfatos y la fijación biológica de nitrógeno (Meena *et al.*, 2016). La identificación de *Bacillus* spp. en los diferentes usos de suelo en este trabajo, corroboraron la abundancia de estas bacterias en sistemas agroforestales como lo indican los trabajos de Gao *et al.* (2019) y Liua *et al.* (2019), también se corroboró la presencia de estas bacterias en pasto como lo había indicado Jorquera *et al.* (2011).

Sin embargo, a diferencia de los resultados de este trabajo, existen reportes previos de bacterias del género *Bacillus* en suelos con caña de azúcar (Singh y Kumari, 2016;

Chandra *et al.*, 2018). Por otra parte, nuestros resultados sobre los suelos con vegetación natural coinciden con lo reportado por Uribe *et al.* (2003) y Ruiz-Sánchez *et al.* (2015) quienes reportaron la presencia de *Bacillus subtilis* y *B. thuringiensis* como microorganismos abundantes en áreas de vegetación natural y bosques tropicales.

Evaluación de bacterias en la promoción de crecimiento de chile habanero

Las semillas de chile habanero inoculadas con las bacterias promotoras del crecimiento vegetal registraron valores entre el 80 y 98% de emergencia, en contraste con el testigo que únicamente alcanzó el 76% (Tabla 2). Los mayores porcentajes de emergencia lo obtuvieron las semillas inoculadas con las bacterias VVM1 y JVN5 (Tabla 2), las cuales de acuerdo al análisis estadístico de Friedman fueron significativamente diferentes ($T^2=6.29$, $p=0.0001$) a las semillas inoculadas con las bacterias FDMC4, EAV2 y el testigo (Tabla 2).

Los resultados de emergencia variaron en relación a

Tabla 2. Emergencia de plántulas de chile habanero inoculadas con cepas de *Bacillus* provenientes de suelos con diferentes usos.

Table 2. Emergence of habanero pepper seedlings inoculated with *Bacillus* strains from soils with different uses.

Cepas	Emergencia (%)	Suma (rangos)	Media (rangos)
VVM1	98	379.50	3.80 ^a
EAV2	80	328.50	3.29 ^{de}
JAG3	86	349.50	3.50 ^{bcd}
FDMC4	83	340.50	3.41 ^{cd}
JVN5	95	376.50	3.77 ^{ab}
Sin inóculo	76	325.50	3.26 ^e

Literales diferentes indican diferencias estadísticas ($p<0.05$) entre tratamientos. Prueba de Friedman, DMS = 28.7.

los efectos de las bacterias, sólo dos cepas (VVM1 y JVN5) tuvieron un efecto significativo a diferencia de las otras bacterias, las cuales fueron estadísticamente iguales al testigo, lo cual corrobora que algunas cepas de *Bacillus* disminuyen o no tienen un efecto estimulante en la germinación de chile habanero como lo reporta Sosa-Pech *et al.* (2019) al obtener una menor germinación en aislados de *Bacillus* CBCC57 y CBFRR5 en relación al testigo.

Estas variaciones del efecto de cepas *Bacillus* en la emergencia se han reportado para pimiento, donde se indica que la aplicación de *Bacillus* sp. MA06 aumentó el porcentaje de emergencia en un 8.0%, pero tres cepas de *Bacillus* no mostraron diferencia significativa con relación a las semillas sin inocular (Luna *et al.*, 2013). Por otro lado, Díaz-Vargas *et al.* (2001) reportaron el efecto de rizobacterias en la emergencia de semillas de lechugas, indicando que el 76.6% de las cepas incrementaron la emergencia, 10% no tuvieron efecto y 13.3% la redujeron.

En nuestro trabajo la cepa VVM1 fue la que promovió mayor porcentaje de emergencia, lo que concuerda con lo reportado por Kaymak *et al.* (2009), donde indican que *B. megaterium* mejoró el porcentaje y la tasa de germinación en

semillas de rábano, que es la especie con que se asocia esta cepa (Tabla 1).

En cuanto a la altura de las plántulas a los 20 ddi, se presentaron diferencias estadísticas significativas, las semillas inoculadas con VVM1 y EAV2 fueron las que alcanzaron la mayor altura (6.86 y 6.75 cm, respectivamente), con respecto a las semillas inoculadas con JVN5 y el testigo (6.34 cm); mientras que en las semillas inoculadas con *Bacillus* sp. FDMC4 y JAG3 no se observaron diferencias estadísticas significativas con los otros tratamientos (Tabla 3).

Por otra parte, a los 20 ddi las plántulas de los tratamientos con JAG3, FDMC4 y VVM1 registraron mayor peso seco (0.0439, 0.0423 y 0.0414 g, respectivamente) y fueron estadísticamente superior que las plántulas con JVN5, EAV2 y el testigo (0.0365, 0.0304 y 0.0297 g, respectivamente) (Tabla 3).

Tabla 3. Altura y peso seco de plántulas de chile habanero inoculadas con cepas de *Bacillus* provenientes de suelos con diferentes usos.

Table 3. Height and dry weight of habanero pepper seedlings inoculated with *Bacillus* strains from soils with different uses.

Cepas	Plántula	
	Altura (cm)	Peso seco (g)
VVM1	6.86 ^a	0.0414 ^a
EAV2	6.75 ^a	0.0304 ^c
JAG3	6.51 ^{ab}	0.0439 ^a
FDMC4	6.70 ^{ab}	0.0423 ^a
JVN5	6.34 ^b	0.0365 ^b
Sin inóculo	6.34 ^b	0.0297 ^c
C.V. (%)	14.1	28.7
E.E.	0.10	0.001

Literales diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

Para el caso de las plantas en macrotúnel, con sustrato inoculado con JVN5 fueron las que alcanzaron una mayor altura inicial (4.69 cm) y fueron significativamente diferentes a las plantas inoculadas con EAV2 (3.06 cm) y el testigo (2.77 cm). Las plantas inoculadas con VVM1, FDMC4 y JAG3 no registraron diferencias significativas en altura inicial de planta (4.06, 3.88 y 3.38 cm, respectivamente) en relación a los otros tratamientos (Tabla 4).

En lo que respecta a la altura final de las plantas inoculadas con EAV2 (38.63 cm), presentaron diferencias estadísticas significativas, con respecto a las plantas inoculadas con FDMC4, *B. VVM1* y el testigo (27.88, 27.38 y 26.83 cm, respectivamente). Por otra parte, las plantas inoculadas con JVN5 y JAG3 no presentaron diferencias significativas con el testigo en relación a la altura final de la planta.

En relación al peso de frutos, en la Tabla 4 podemos observar que las plantas inoculadas con EAV2 (6.45 g) tuvieron el mayor peso de frutos y fueron significativamente diferentes a las plantas con FDMC4, JVN5 y el testigo (3.96, 3.66 y 2.20 g, respectivamente). También podemos observar en la Tabla 4, que las plantas con JAG3 (5.74 g) y VVM1 (5.61 g) fueron significativamente diferentes al testigo, pero no a los otros tratamientos con bacterias.

Tabla 4. Efecto de cepas de *Bacillus* en la altura inicial y final de plantas y peso de fruto de chile habanero.

Table 4. Effect of *Bacillus* strains on the initial and final height of plants, and fruit weight of habanero pepper.

Cepas	Altura de planta (cm)		Peso de fruto (g)
	Inicial	Final	
VVM1	4.06 ^{ab}	27.38 ^c	5.61 ^{ab}
EAV2	3.06 ^b	38.63 ^a	6.45 ^a
JAG3	3.38 ^{ab}	35.63 ^{ab}	5.74 ^{ab}
FDMC4	3.88 ^{ab}	27.88 ^{bc}	3.96 ^{bc}
JVN5	4.69 ^a	35.75 ^{ab}	3.66 ^{bc}
Sin inóculo	2.77 ^b	26.83 ^c	2.20 ^c
C.V. (%)	29.6	17.5	35.7
E.E.	0.37	1.96	0.56

Literales diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

Los resultados obtenidos permiten inferir que las cepas de *Bacillus* en este trabajo fueron capaces de promover alguna de las siguientes variables en chile habanero, altura de plántula, peso seco de plántula, altura inicial y final de planta y peso de fruto, en comparación al testigo. Sin embargo, destacaron por sus efectos las cepas VVM1, EAV2 y JVN5. Lo anterior pudo ser debido a que algunas bacterias del género *Bacillus* inducen diferentes mecanismos relacionados con la promoción de crecimiento en las plantas de chile, resultando una expresión diferente en las plantas (Guillén-Cruz *et al.*, 2006), por lo cual surge la importante necesidad de identificar a nivel especie estas cepas mediante filogenias multilocus.

Al respecto, Sosa-Pech *et al.* (2019) han reportado que aislados del género *Bacillus* promueven el crecimiento a nivel de plántula de chile habanero, entre sus tratamientos, los aislados CBCC57 y CBRF12 promovieron el crecimiento en altura de planta y área foliar. En contraste a nuestros resultados sobre que *B. subtilis* no tuvo efecto en el crecimiento de las plantas, pero si en el peso seco, Kokalis-Burelle *et al.* (2002) encontró que la formulación LS256 (*Bacillus subtilis* GBO3 y *B. pumilis* INR7) promovió el crecimiento del tallo, raíz y parte aérea en plántulas de chile.

En relación a *B. megaterium* inoculadas a plantas de tomate, se ha reportado que mejoran significativamente el grosor del tallo, número de ramas, área foliar, contenido de pigmentos fotosintéticos, contenido mineral, contenido total de azúcares, carbohidratos y proteína cruda en las hojas, así como el amarre de frutos, la producción temprana y total de frutos (El-Yazeid y Abou-Aly, 2011). Por otro lado, Surette *et al.* (2003) aislaron *B. megaterium* de cultivos de zanahoria, el cual mostró efectos positivos en el crecimiento de la planta.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos las cepas VVM1, EAV2 y JVN5 son bacterias que promueven la emergencia, altura y peso seco de plántulas, así como la altura de la planta y peso de fruto de chile habanero, por lo que

la inoculación con estas cepas mejora el desarrollo de las plántulas, plantas y frutos de chile habanero; sin embargo, se requieren estudios de validación de las cepas a nivel de producción, en condiciones protegidas y de cielo abierto para evaluar el efecto en el desarrollo y producción de chile habanero en condiciones comerciales.

Este estudio constituye un aporte al conocimiento científico sobre la diversidad que existe entre cepas de *Bacillus* provenientes de diferentes usos de suelo, así como su potencial aplicación como bacterias promotoras de crecimiento vegetal.

AGRADECIMIENTOS

Al Tecnológico Nacional de México por el financiamiento de los proyectos 6218.19-P y 10544.21-P. Al Consejo Veracruzano de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico por financiar el proyecto 14 2252.

LITERATURA CITADA

- Arenas-Julio, Y.R., Escalante-Estrada, J.A.S., Aguilar-Carpio, C., Rodríguez-González, M.T. y Sosa-Montes, E. 2021. Rentabilidad y rendimiento de girasol en función del tipo de suelo, nitrógeno y biofertilizante. *Biotecnia*. 23(1): 45-51.
- Benbi, D.K. 2013. Greenhouse Gas Emissions from Agricultural Soils: Sources and Mitigation Potential. *Journal of Crop Improvement*. 27(6): 752-72.
- Chandra, P., Tripathi, P. y Chandra, A. 2018. Isolation and molecular characterization of plant growth-promoting *Bacillus* spp. and their impact on sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) growth and tolerance towards drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 40, 199: 1-15.
- Corrales, R.L.C., Caycedo, L.L., Gómez, M.M.A., Ramos, R.S.J. y Rodríguez, T.J.N. 2017. *Bacillus* spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *NOVA*. 15 (27): 45-65.
- Díaz-Vargas, P., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz-Suárez, J.J. y Alcántar-González, G. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra Latinoamericana* 19: 327-335.
- El-Yazeid, A.A. y Abou-Aly, H.E. 2011. Enhancing growth, productivity and quality of tomato plants using phosphate solubilizing microorganisms. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 5: 371-379.
- Espinosa-Palomeque, B., Cano-Ríos, P., Salas-Pérez, L., García-Hernández, J.L., Preciado-Rangel, P., Sáenz-Mata, J. y Reyes-Carrillo, J. L. 2019. Bioinoculantes y concentración de la solución nutritiva sobre la producción y calidad de tomate. *Biotecnia*. 21(3): 100-107.
- Franco, A.L.C., Bartz, M.L.C., Cherubin, M.R., Baretta, D., Cerri, C.E.P., Feigl, B.J., Wall, H.D., Davies, A.C. y Cerri, C.C. 2016. Loss of soil (macro) fauna due to the expansion of Brazilian sugarcane acreage. *Science of the Total Environment*. 563-564: 160-168.
- Gao, P., Zheng, X., Wang, L., Liu, B. y Zhang, S. 2019. Changes in the Soil Bacterial Community in a Chronosequence of Temperate Walnut-Based Intercropping Systems. *Forests*. 10, 299: 1-14.
- Giraffa, G., Rossetti, L. y Neviani, E. 2000. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 42: 175-184.
- Grageda-Cabrera, O.A., Díaz-Franco, A., Peña-Cabriales, J.J. y Vera-Núñez, J.A. 2012. Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3(6):1261-1274.
- Guillén-Cruz, R., Hernández-Castillo, F.D., Gallegos-Morales, G., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar-González, C.N., Padrón-Corral, E. y Reyes-Valdés, M.H. 2006. *Bacillus* spp. como Biocontrol en un Suelo Infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su Efecto en el Desarrollo y Rendimiento del Cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24(2): 105-114.
- Jorquera, M.A., Crowley, D.E., Marschner, P., Greiner, R., Fernández, M.T., Romero, D., Menezes-Blackburn, D. y Mora, M. de la L. 2011. Identification of *B*-propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. *FEMS Microbiology Ecology*. 75:163-172.
- Kaur, B., Gupta, S., y Singh, G. 2002. Bioamelioration of a sodic soil by silvopastoral systems in northwestern India. *Agroforestry Systems*. 54: 13-20.
- Kaymak, H.C., Guvenc, I., Yarali, F. y Donmez, M.F. 2009. The effects of bio-priming with PGPR on germination of radish (*Raphanus sativus* L.) seeds under saline conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 33(2):173-179.
- Kokalis-Burelle, K., Vavrina, C.S., Roskopf, E.N. y Shelby, R.A. 2002. Field evaluation of plant growth-promoting Rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. *Plant and Soil*. 238: 257-266.
- Liua, C., Jina, Y., Hub, Y., Tanga, J., Xiongq, Q., Xud, M., Bibia, F. y Bengel, K.C. 2019. Drivers of soil bacterial community structure and diversity in tropical agroforestry systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 278: 24-34.
- Luna, M.R.A., Reyes, P.J.J., Espinosa, C.K.A., Luna, M.M.V., Luna, Q.F.V., Celi, M.M.V., Espinoza, C.A.L., Rivero, H.M., Cabrera, B.D.A., Alvarado, M.A.F. y González, R.J.C. 2016. Efecto de diferentes abonos orgánicos en la producción de tomate (*Solanum lycopersicum*, L). *Biotecnia*. 18(3): 33-36.
- Luna, M.L., Martínez, P.R.A., Hernández, I.M., Arvizu, M.S.M. y Pacheco, A.J.R. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36: 63-69.
- Mantilla-Paredes, A.J., Cardona, G.I., Peña-Venegas, C.P., Murcia, U., Rodríguez, M., Zambrano, M.M. 2009. Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. *Revista de Biología Tropical*. 57(4): 915-927.
- Meena, V.S., Maurya, B.R., Meena, S.K., Meena, R.K., Kumar, A., Verma, J.P. y Singh, N.P. 2016. Can *Bacillus* Species Enhance Nutrient Availability in Agricultural Soils?. En: M. Islam, M. Rahman, P. Pandey, C. Jha y A. Aeron (eds.), pp 367-395. *Bacilli and Agrobiotechnology*. Springer, Cham.
- Mendivil-Lugo, C., Nava-Pérez, E., Armenta-Bojórquez, A.D., Ruelas-Ayala R.D., Félix-Herrán, J.A. 2020. Elaboración de un abono orgánico tipo bocashi y su evaluación en la germinación y crecimiento del rábano. *Biotecnia*. 22(1): 17-23.
- Murillo-Cuevas, F.D., Adame-García, J., Cabrera-Mireles, H. y Fernández-Viveros, J.A. 2019. Fauna y microflora edáfica

- asociada a diferentes usos de suelo. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios. 6 (16): 23-33.
- Paudel, B.R., Udawatta, R.P., Kremer, J.R., y Anderson, S.H. 2012. Soil quality indicator responses to row crop, grazed pasture, and agroforestry buffer management. *Agroforestry Systems*. 84: 311-323.
- Ramírez-Vargas, B. A., Carrillo-Ávila, E., Obrador-Olán, J. J., Coh-Méndez, D., Monsalvo-Espinosa, A., y Aceves-Navarro, E. 2019. Aplicación del modelo simplificado para estimar dosis sustentables de fertilización fosforada en el cultivo de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 27(78): 23-33.
- Reyes, G. y D. Cortéz. 2017. Intensidad en el uso de fertilizantes en América Latina y el Caribe (2006-2012). *Bioagro*. 29 (1): 45-52.
- Reyes-Pérez, J.J., Luna-Murillo, R.A., Zambrano-Burgos, D., Vázquez-Morán, V.F., Rodríguez-Pedroso, A.T., Ramírez-Arrebato, M.Á., Guzmán-Acurio, J.A., González-Rodríguez, J.C. y Torres-Rodríguez, J.A. 2018. Efecto de abonos orgánicos en el crecimiento y rendimiento agrícola de la berenjena (*Solanum melongena* L.). *Biotecnia*. 20(1): 8-12.
- Ríos, R.Y., Dibut, Á.B., Rojas, B.M., Ortega, G.M., Arozarena, D.N. y Rodríguez, S.J. 2016. Interacción de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* y hortalizas de raíz. *Cultivos Tropicales*. 37: 28-32.
- Rodríguez-Hernández, M.G., Gallegos-Robles, M.Á., Rodríguez-Sifuentes, L., Fortis-Hernández, M., Luna-Ortega, J.G. y González-Salas, U. 2020. Cepas nativas de *Bacillus* spp. como una alternativa sostenible en el rendimiento de forraje de maíz. *Terra Latinoamericana*. 38: 313-321.
- Ruiz-Bello, R., Nava-Tablada, M.E., Landeros-Sánchez, C. y Díaz-Padilla, G. 2016. Potencial productivo y limitantes para el cultivo de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en el estado de Veracruz, México. *RINDERESU*. 1(1): 01-11.
- Ruiz-Sánchez, E., Mejía-Bautista, M.Á., Serrato-Díaz, A., Reyes-Ramírez, A., Estrada-Girón, Y. y Valencia-Botín, A.J. 2016. Antifungal activity and molecular identification of native strains of *Bacillus subtilis*. *Agrociencia*. 50:133-148.
- Saharan, B.S. y V. Nehra. 2011. Plant growth promoting Rhizobacteria: A critical review. *Life Sciences and Medicine Research*. 21: 1-30.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP, Blog. [Consultado 11 febrero 2021] 2016. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/articulos/somos-noveno-productor-de-hortalizas-a-nivel-mundial>
- Singh, P. y Kumari, P. 2016. Isolation and characterization of amylase producing *Bacillus* spp. from selected soil sample. *International Journal of Research in Biosciences*. 5 (2): 24-29.
- Sosa-Pech, M., Ruiz-Sánchez, E., Tun-Suárez, J.M., Pinzón-López, L.L. y Reyes-Ramírez A. 2019. Germinación, crecimiento y producción de glucanasas en *Capsicum chinense* Jacq. inoculadas con *Bacillus* spp. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 6(16):137-143.
- Subhash, Y., Rajeev, K., Saxena, A.K. y Arora, D.K. 2015. Diversity and phylogeny of plant growth-promoting bacilli from moderately acidic soil. *Journal of Basic Microbiology*. 51: 98-106.
- Surette, M.A., Sturz, A.V., Lada, R.R. y Nowak, J. 2003. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant and Soil*. 253(2): 381-390.
- Torres, R.J.A., Reyes, P.J.J. y González, R.J.C. 2016. Efecto de un bioestimulante natural sobre algunos parámetros de calidad en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*, L.) bajo condiciones de salinidad. *Biotecnia*. 18(2): 11-15.
- Uribe, D., Martínez, W. y Cerón, J. 2003. Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 82: 119-127.
- Vallejo-Quintero, V.E. 2013. Importancia y utilidad de la evaluación de la calidad de suelos mediante el componente microbiano: experiencias en sistemas silvopastoriles. *Colombia Forestal*. 16(1): 83-99.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil* 255(2): 571-586.

Removal of Eriochrome Black T from water using a chitosan/zeolite composite: a kinetic study

Remoción de negro de Eriocromo T de agua utilizando un material compuesto a base de quitosano/zeolita: un estudio cinético

Héctor Manuel Guzmán Grijalva^{1*}, Juana Alvarado Ibarra², Martín Francisco Zamarrón Pulé¹, Javier Esquer Peralta¹

¹ Departamento de Ingeniería Industrial, Universidad de Sonora. Boulevard Luis Encinas y Rosales S/N. Colonia Centro, CP 83000, Hermosillo, Sonora, México.

² Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora. Boulevard Luis Encinas y Rosales S/N. Colonia Centro, CP 83000, Hermosillo, Sonora, México.

ABSTRACT

A composite material was prepared using chitosan and chabazite for the removal of Eriochrome T black dye from water. Scanning electron microscopy (SEM) analyses showed chabazite particles embedded in the chitosan matrix. Thermogravimetric analyses indicated that chitosan degrades chemically at temperatures above 225 °C; chabazite only experiences weight decrease due to moisture loss. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analyses on chitosan detected the presence of O-H, N-H, C-H, C-N and C-O bonds, protonated amino groups and saccharides. In chabazite, H₂O molecules, T-O and O-T-O groups, where "T" corresponds to Si or Al atoms, isolated H-bonded O-H groups, and Si-O-Si groups were detected. In kinetic experiments, an 86 % decrease of the dye concentration in solution was achieved in approximately 500 minutes. The linearization method was used to evaluate the fit of the experimental data with the pseudo-first-order, pseudo-second order, Elovich and intra-particle diffusion adsorption kinetic models. The kinetic experiments showed that the sorption mechanism corresponds to a pseudo-second order model.

Keywords: adsorption, composite, chitosan, chabazite, kinetic model

RESUMEN

Se preparó un material compuesto utilizando quitosano y chabazita para la eliminación del colorante negro eriocromo T del agua. Los análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) mostraron que las partículas de chabazita se incrustaron en la matriz de quitosano. Los análisis termogravimétricos indicaron que el quitosano se degrada químicamente a temperaturas superiores a 225 °C; la chabazita sólo experimenta una disminución de peso debido a la pérdida de humedad. Los análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) en el quitosano detectaron la presencia de enlaces O-H, N-H, C-H, C-N y C-O, grupos amino protonados y sacáridos. En la chabazita se detectaron moléculas de H₂O, grupos T-O y O-T-O, donde la "T" corresponde a átomos de Si o Al, grupos O-H aislados y con enlaces H, y grupos Si-O-Si. En los experimentos cinéticos, se logró una disminución del 86 % de la concentración de colorante en

la solución en aproximadamente 500 minutos. Se utilizó el método de linealización para evaluar el ajuste de los datos experimentales con los modelos cinéticos de adsorción de pseudo-primero orden, pseudo-segundo orden, Elovich y difusión intra-partícula. Los experimentos cinéticos mostraron que el mecanismo de sorción corresponde a un modelo de pseudo-segundo orden.

Palabras clave: adsorción, material compuesto, quitosano, chabazita, modelo cinético

INTRODUCTION

The textile industry employs large amounts of water for dyeing and washing processes, generating large volumes of effluents (Cestarolli *et al.*, 2019). It is estimated that between 10 and 15% of dyes used do not adhere to the textile fibers and are released into the environment (Lakhan *et al.*, 2015).

Dyes are classified based on chemical structure, source, solubility, and use (Gürses *et al.*, 2016). In particular, azo-type dyes are synthetic compounds widely used in textile industry because of their stability to light, and resistance to microbial degradation and to fading in washing processes. Nevertheless, they are also toxic, mutagenic, cancerogenic and harmful to marine life and photosynthetic processes of aquatic plants (Álvarez *et al.*, 2015). Eriochrome T black is an azo-type colorant used in the textile industry for dyeing silk, wool, and nylon fibers after pretreatment with chromium salts (Moeinpour *et al.*, 2014; Karimi *et al.*, 2018) that has been found to be particularly dangerous and carcinogenic; compounds generated from its degradation, such as naphthoquinone, are carcinogenic to an even greater degree (Khurana *et al.*, 2018). For these reasons, the development of efficient, low-cost adsorbents for the removal of colorants such as Eriochrome T black from aqueous solutions is of the utmost importance (Park *et al.*, 2018).

Among the numerous investigations on biological, chemical, and physicochemical treatments for the removal of colorants in water, adsorption stands out as one of the most promising methods (Tran *et al.*, 2015). Adsorption consists of removing substances initially dissolved in a liquid or gas phase by their accumulation in an adsorbent material

(Oladoja *et al.*, 2017). Compared to other techniques, adsorption offers significant advantages such as high availability of materials and equipment, relatively low cost, easy operation, good contaminant removal efficiency, and effectiveness (Uddin, 2017). Its effectiveness depends on parameters such as sorbent particle size and surface morphology, pH, temperature, and concentration of the water to be treated (Ahmad *et al.*, 2015).

Some of the materials most commonly used as adsorbents are silica gel, alumina and activated carbon. However, zeolites have been widely used to remove pollutants present in water by exhibiting a vast internal microporous surface in relation to the external one, and high adsorption capacity in addition to ion exchange properties (Li *et al.*, 2015).

On the other hand, the application of chitosan, a polycationic polysaccharide, in water treatment has been exceptionally advantageous and constitutes an alternative to commonly used adsorbent materials (Kumar *et al.*, 2018). Chitosan derives from chitin and is very easy to obtain since it mainly comes from the waste of the fishing industry (Kyzas and Bikiaris, 2015). It is remarkably versatile and can be modified in different ways or combined with other types of materials to increase its adsorption capacity. However, it is also susceptible to pH, has inadequate mechanical strength, and has low thermal stability (Lou and Deng, 2019). Chitosan-zeolite composites combine the physical properties of their components to obtain new structural or functional properties. In particular, zeolite improves the mechanical strength of the resulting material by becoming the dispersed phase within the chitosan polymeric matrix (Flores, 2015). This research project aims to evaluate, in kinetic terms, the performance of a chitosan-chabazite composite in removing the colorant Eriochrome Black T from water by using bench tests.

MATERIALS AND METHODS

Only analytical grade reagents and deionized water were used in the experiments conducted in this research. Low molecular weight deacetylated chitosan, acetic acid, and sodium hydroxide were supplied by Sigma-Aldrich, Fermont and J.T. Baker, respectively. Chabazite type zeolite was obtained from a natural deposit located in the state of Sonora, Mexico. Indicator grade Eriochrome Black T (EBT) colorant from Sigma-Aldrich was used to prepare a 50 ppm stock solution with deionized water. 0.25 M sodium hydroxide and 5% (v/v) acetic acid solutions were used to produce the composite material.

Preparation of chabazite

A sample of chabazite was ground using a hand mortar and then sifted to obtain 100-mesh size particles. Subsequently, the mineral was rinsed twice in a beaker with deionized water, each episode with a duration of 10 min during which shaking was provided. Afterwards, the mixture was let standing still to allow the settling of chabazite particles so that decantation could be used to separate them. Chabazite

sample was then dried for 24 h at 60 °C and a product in the form of flakes was finally obtained. Chabazite was ground once more with a hand mortar as to obtain a fine powder.

Preparation of composite

Composite was prepared using the technique described by Perez *et al.* (2016). The procedure involves the dissolution of 3 g of chitosan in 50 mL of a 5% (v/v) acetic solution to obtain a chitosan solution. Separately, 3 g of chabazite were mixed with 20 ml of deionized water. Both mixtures were stirred separately for 20 min and then mixed. The resulting mixture was agitated at 60 °C for 4 hours using a magnetic bar spinning at 1,200 rpm. After stirring, the chitosan and chabazite mixture was added drop by drop to 500 mL of 0.25 M NaOH solution. This mixture was stirred for 3 hours using a magnetic bar spinning at 200 rpm while solid beads of composite formed within the mixture. Beads were separated by filtration from the liquid phase and rinsed several times with deionized water to be finally dried at 45°C for 48 hours.

Composite characterization

In order to know the surface morphology of the material, Scanning Electron Microscopy (SEM) technique was employed using an equipment JEOL, model JSM-5410LV. The presence of specific structural units at a molecular level was analyzed using a Perkin Elmer Frontier Fourier-transform infrared (FTIR) spectrometer. Physical and chemical thermic-related changes in material structure were analyzed utilizing a Perkin Elmer Pyris TGA Thermogravimetric Analyzer. The procedure consisted of placing 2.52 ± 0.19 mg of sample in a ceramic sample holder and heating it to 900 , at a rate of 10 per minute, in an atmosphere of nitrogen and dry air, using a 20 mL min⁻¹ flow.

Kinetic experiments and models

A 50 ppm stock solution of colorant was prepared. 20 aliquots of 15 mL each were added to 50 mL flasks containing 0.5 g of composite and constant agitation was immediately provided. A different contact time between the colorant solution and the composite was assigned to each flask as to obtain a sorption curve. Aliquots' final eriochrome black T concentrations for each contact time were determined using a Lambda 20 scanning double-beam spectrometer for the UV/Vis range from Perkin Elmer at a $\lambda_{\max} = 570$ nm.

RESULTS AND DISCUSSION

Two or more constituents with distinct characteristics form composites, one of them acting as the matrix (bulk phase) and the rest as reinforcement (dispersed phase). Components essentially maintain and complement their properties after combining. In composites, the weakness of the matrix is reduced with the assistance of the appropriate filler (Taaca and Vasquez Jr., 2017). The importance of composites ensues from the variety of their applications.

Chitosan is a linear copolymer of linked β -(1,4)-glucosamine molecules that can be easily obtained (figure 1) by the deacetylation reaction of the acetoamide groups in chitin using an alkaline solution (Szatkowski *et al.*, 2015). This reaction produces a high quantity of amino groups, situated at the C-2 position, that can be protonated and interact with organic dyes, like anionic azo-type, and many metals anions (Saha *et al.*, 2010). The electrolytic and chelating ability of chitosan is determined by the protonation degree of the group ($pK=6.3$), which is dependent on pH (Dambies *et al.*, 2001; An and Dultz, 2007). At $pH < 6.3$, the free amino groups become protonated and positively charged. At a $pH > 6.3$, amino groups deprotonate, and chitosan exhibits no charge. Additionally, two more reactive functional groups are present in the chitosan polymeric chain, namely, the primary and secondary hydroxyl groups, at the C-3 and C-6 positions, respectively. The OH groups, as the amino groups, also act as coordination and reaction sites for transition metals, organic species and dyes.

Zeolites are microporous minerals with a framework formed by aluminate and silicate tetrahedra that share vertices. The presence of the aluminum atoms creates a negative charge in the porous structure that leads to the adsorption of a variety of easily exchangeable cations, such as Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+} , that in turn, can become attached to negatively charged molecules (Bailie *et al.*, 2001; Moienpour *et al.*, 2014; Montalvo *et al.*, 2020). When incorporated as the dispersed phase of a composite, zeolites can provide a rigid and stable structure to the resulting material (Taaca and Vasquez Jr., 2017). The high positive density of chitosan and zeolite favors the adsorption process of anionic dyes like EBT (Moienpour *et al.*, 2014; Attallah *et al.*, 2016).

Morphological analyses

Figure 2 shows, with an increasing level of magnification, the particle morphology of the composite material that

was obtained. Amplifications in images 2A), 2B), 2C), and 2D) are 50X, 1 000X, 2 000X, and 5 000 X, respectively. In figure 2A), chabazite encrustations corresponding to chabazite particles becoming encapsulated into the polymeric chitosan matrix can be seen on the surface of the composite material. The formation of an uneven surface is attributable to a relatively high proportion of zeolite with respect to chitosan, making zeolite more accessible in the composite (2 A, B, and C). The absence of porosity despite the presence of zeolite has been cited as a consequence of evaporative drying being used as part of the composite preparation process, ultimately leading to the obstruction of zeolite microporous (Djelad *et al.*, 2016). The level of detail that was finally obtained allowed chabazite rhombohedral crystals to be noticeable.

Functional groups identification

Curves showing absorbance variation for the range of 500 cm^{-1} to $4,000\text{ cm}^{-1}$ from FTIR analyses of composite and chitosan are shown in figure 3. In the chitosan spectrum, the structural units present, identified by the wave number of their bands, are the following: O-H and N-H centered around 3360 cm^{-1} , characteristic of alcohols, amines, and amides present in the deacetylated solid structure; C-H at 2880 cm^{-1} , protonated amino group at 1585 cm^{-1} , saccharide unit of chitosan at 1148 cm^{-1} , and C-N and C-O at 1029 cm^{-1} (Bashir *et al.*, 2019). For chabazite, it has been reported two types of building units vibrations are characteristic; some corresponding to O-T-O symmetric, and asymmetric stretching and bending, and those related to T-O-T linkages that involved a bridging oxygen atom; where T designates a Si or Al atom in the chabazite TO_4 tetrahedral building unit (Dimowa *et al.*, 2018), with strong bands associated to Si-O-Si and Si-O-Al groups vibrations are located in the wavelength region of 700 to 1200 cm^{-1} . Also, a band at roughly 1650 cm^{-1} represents the bending vibration of H_2O molecules and T-O stretching (Falk, 1984; Dimowa *et al.*, 2018) and those at approximately 3670

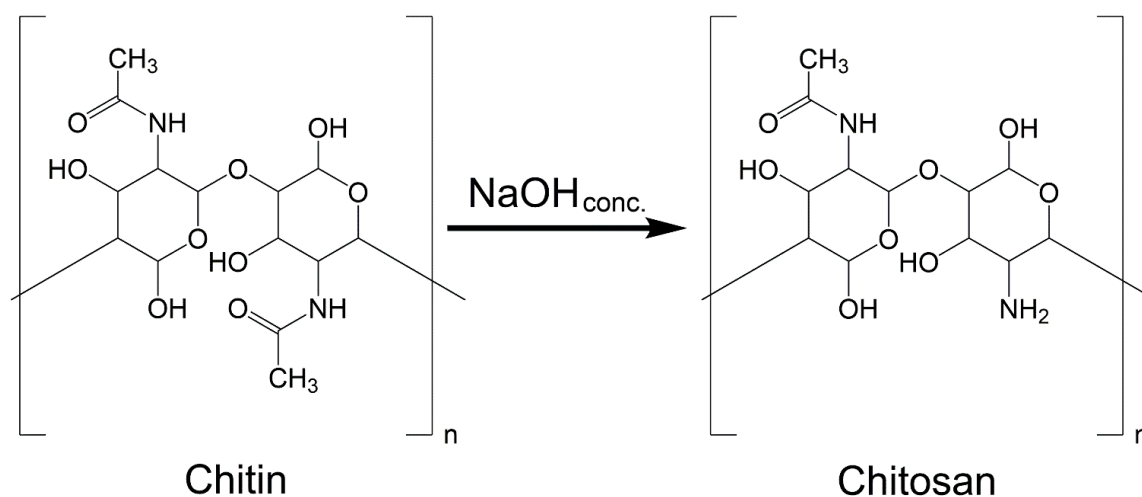


Figure 1. Schematic depiction of the chitin deacetylation reaction to form chitosan based on the representation from Szatkowski *et al.*, 2013.

Figura 1. Descripción esquemática de la reacción de desacetilación de quitina para formar quitosano basada en la representación de Szatkowski *et al.*, 2013.

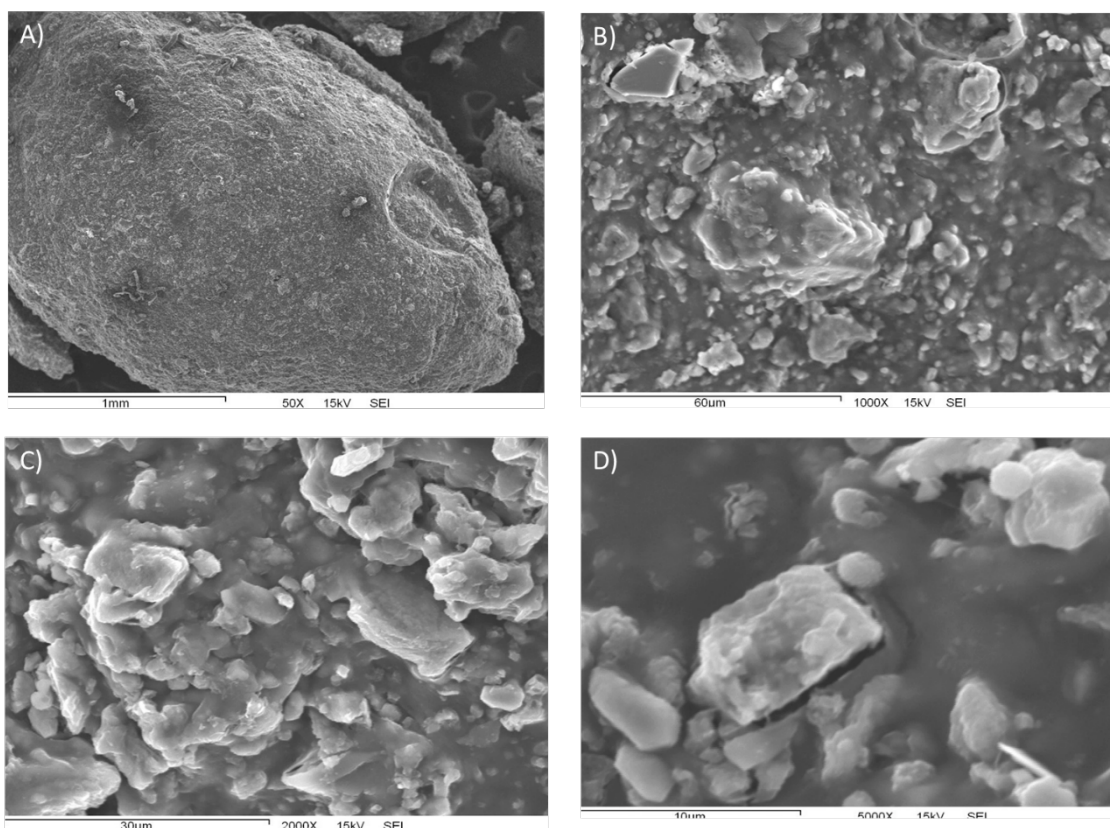


Figure 2. SEM image showing the morphology of the composite using a magnification of A) 50 X, B) 1 000 X, C) 2 000 X, and D) 5 000 X.

Figura 2. Imagen de MEB que muestra la morfología del material compuesto empleando una amplificación de A) 50 X, B) 1 000 X, C) 2 000 X y D) 5 000 X.

and 3450 cm^{-1} denote isolated and H-bonded O-H stretching, respectively (Aysan *et al.*, 2019). Bands corresponding to 6 membered rings are located between 570 and 635 cm^{-1} ; H_2O bending and T-O stretching at approximately 1660 and 1044 cm^{-1} , respectively, isolated and H-bonded O-H stretching at 3669 and 3443 cm^{-1} , respectively, and external T-O at 762 cm^{-1} (Aysan *et al.*, 2016).

The composite spectrum shows peaks at approximately 3360 , 2880 , and 1585 cm^{-1} like chitosan, and at 1650 cm^{-1} similarly to chabazite. The peak at approximately $1,030\text{ cm}^{-1}$ coincides with bands of both, chitosan and zeolite, located in the vicinity of that value.

Thermal stability results

The results of the thermo-gravimetric analysis shed light on the thermo-resistance of the composite material and determine the temperature at which changes affecting its chemical structure occur. The progressive weight loss that ensued as temperature increased is shown in figure 4. Three important stages can be identified along the curve describing the weight decrement associated with temperature increase; the first one takes place between $30\text{ }^\circ\text{C}$ and $225\text{ }^\circ\text{C}$ and corresponds to a 12.5% weight reduction in the composite material originated by moisture loss. This was followed by a significant decrease of up to 24.5% between $225\text{ }^\circ\text{C}$ to $455\text{ }^\circ\text{C}$, that becomes particularly abrupt at $275\text{ }^\circ\text{C}$,

that relates to the degradation of the saccharides in the molecular structure of the chitosan. Finally, the last stage occurs when temperature increases from $455\text{ }^\circ\text{C}$ to $790\text{ }^\circ\text{C}$, and leads to the final decomposition of the material at approximately $680\text{ }^\circ\text{C}$. This behavior is in accordance with what was reported by Escobar *et al.* (2013), and Djelad *et al.* (2016).

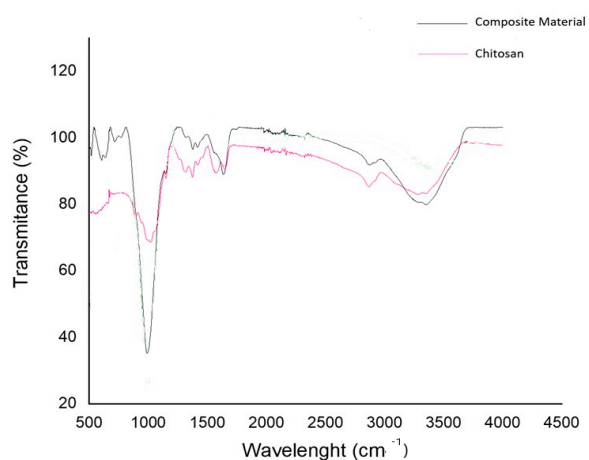


Figure 3. FTIR spectrums of chitosan and composite.
Figura 3. Espectros FTIR del quitosano y el material compuesto.

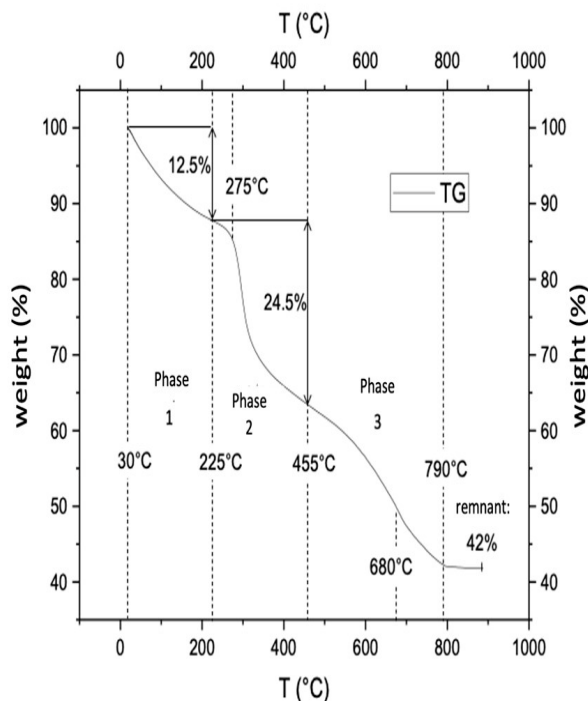


Figure 4. Weight reduction for composite material obtained from the thermogravimetric analysis results.

Figura 4. Pérdida de peso del material compuesto obtenida de los resultados de los análisis termogravimétricos.

The analysis shows that dry chabazite accounts for 42% of the total mass of the composite material. This can be seen more clearly in figure 5, where the paths of weight loss through time obtained from thermogravimetric analyses performed on separate samples of zeolite, composite material and chitosan are shown graphically. The curve on the top reveals that the total weight reduction for zeolite came to be approximately 15 % of its initial value. The curve describes the gradual loss of weight that took place as temperature rose from 25 to 300 °C and the stabilization of sample weight that ensued from this point up to 900 °C. The noticeable absence of inflection points denotes that only one mechanism is responsible for the initial weight loss, namely, loss of humidity, and that no chemical transformations in zeolite structure that involve the release of gaseous compounds ever occurred. Curves corresponding to composite material and chitosan, exhibit a similar shape, though chitosan curve, previously shown with more detail in figure 4, is much steeper than that of the composite. The temperatures at which inflection points are located along these two curves are strikingly similar up to 400 °C; above it, the inflection points in the composite material curve are shown at a higher temperature than in that of chitosan. This seems to indicate that chitosan, when being an integral part of the composite, degrades at a slower rate than pure chitosan at high temperatures.

Adsorption kinetics

Experimental data, were analyzed using the linearized forms of the equations corresponding to pseudo-first order

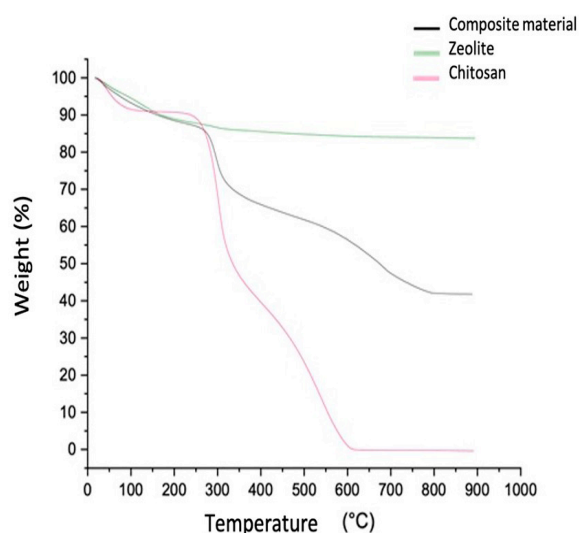


Figure 5. Chart showing the path of weight reduction for zeolite, composite and chitosan obtained from the thermogravimetric analyses results.

Figura 5. Gráfica de la pérdida de peso de la zeolita, el material compuesto y el quitosano obtenida de los resultados de los análisis termogravimétricos.

(PFO) (Lagergren and Vetenskapsakademiens, 1898); the pseudo-second order (PSO), the intraparticle diffusion (IP), and the Elovich models.

The equation for Lagergren's pseudo-first order model is:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (\text{Eq. 1})$$

Where q_e (mg/g) designates the concentration of col- orant in the composite material once equilibrium has been reached and q_t (mg/g) to the solid phase concentration at a particular time t (min), while k_1 (min^{-1}) denotes the first-order rate constant.

Assumptions made regarding this model are: 1) ad- sorption takes place exclusively in specific sites and adsorbed ions do not interact with one another; 2) adsorption energy is not determined by surface coverage; 3) only a monolayer of adsorbate can be formed on sorbent surface and, conse- quently, a saturated monolayer constitutes the maximum level of adsorption that can be attained, 4) adsorbate con- centration is essentially constant, and 5) adsorbate sorption obeys a first-order rate equation (Largitte and Pasquier, 2016).

The equation describing the PSO kinetics model, de- veloped by Ho and McKay (1999), is:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (\text{Eq. 2})$$

In which k_2 ($\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) designates the PSO rate con- stant and the rest of the variables have the same meaning as in the first-order rate equation. According to this model, adsorption rate depends on the number of active sites

available on the solute surface, being the difference between solid phase concentration at equilibrium and its value at any particular time prior to reaching that state, the driving force behind the process (Kajjumba *et al.*, 2018).

Sorption data from systems that conforms to the IP model fit the following equation:

$$q_t = k_p t^{0.5} + C \quad (\text{Eq. 3})$$

If such is the case, by plotting q_t values versus $t^{0.5}$, a straight line, with a slope equal to k_p and with the value for C being given by intersection with axis y , will be obtained. k_p ($\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-0.5}$), is the IP diffusion rate constant, and C (mg g^{-1}) is a parameter related to boundary layer thickness.

This model is used to determine if one particular step of the adsorption process controls adsorption rate; three stages being considered. The first one, referred to as film diffusion, relates to sorbate gradual migration from boundary layer to sorbent surface. Then, adsorbate internal diffusion into pores comes about, followed by its final attachment to active sorption sites inside pores (Pholosi *et al.*, 2020). Which stage exerts a higher influence in the adsorption process depends on system conditions. In systems with very limited agitation and low concentration, film diffusion acts as the rate controlling step; otherwise, the adsorption is controlled by IP diffusion.

According to the Elovich model, adsorption is ruled by the equation:

$$q_t = \frac{1}{\beta} \ln(\beta\alpha) + \frac{1}{\beta} \ln t \quad (\text{Eq. 4})$$

Where α ($\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$) is the initial adsorption rate, while β (g mg^{-1}) is desorption constant. This model assumes that solute concentration decreases exponentially while the amount of solute adsorbed increases (Kajjumba *et al.*, 2018).

Data obtained from kinetic experiments consisted of colorant concentration values in the liquid phase measured at different times, when the solution initial concentration, pH and volume were kept constant, as well as the amount of sorbent used. Figure 6 shows the decrease in the liquid concentration of Eriochrome Black T colorant with time when 15 mL of a 50 ppm solution were placed in contact with 0.5 g of composite material. The concentration of the solution once equilibrium was reached was approximately 7.0 ppm and that of sorbent 4.25 mg g^{-1} . This represents an 86% reduction of solution dye concentration in approximately 500 minutes and implies that the material has the capacity of appreciably removing Eriochrome Black T dye from water.

The extent to which the values derived from experimental information actually fitted a straight line, when the linearized forms of the equations describing each particular kinetic model were considered, was assessed by plotting $\ln(q_e - q_t)$ vs t for the PFO model case, and $\frac{t}{q_t}$ vs t , q_t vs $t^{0.5}$ and q_t vs $\ln t$ for the PSO, IP, and Elovich models, respectively. The appropriateness of data distributions fitting to a straight line

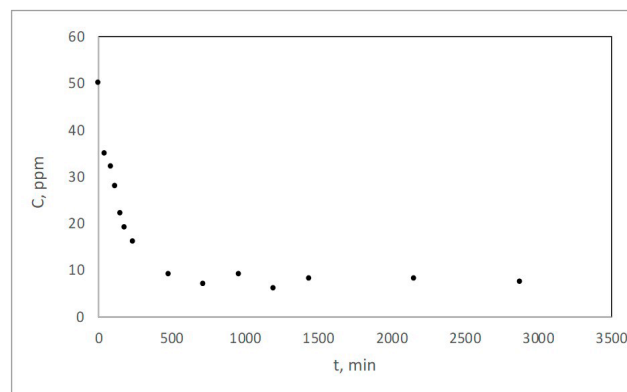


Figure 6. Change in solution dye concentration with time in the kinetic experiments.

Figura 6. Cambio en la concentración de la solución de colorante a través del tiempo en los experimentos cinéticos.

was evaluated using linear regression analysis. The values of the linear correlation coefficient, R , obtained in each case are shown in the respective plots (figure 7).

The PFO and PSO models have been commonly used to characterize the nature of an adsorption process. Neither of these two approaches take into account the effect of mass diffusion in relation to the adsorption/desorption process, but rather they are based on the consideration that it is the rate at which the sorbate interacts with the sorbent surface, and the type of that interaction, assumed to be inherently irreversible in nature, that actually controls the sorption kinetics (Plazinski *et al.*, 2013). For systems that fit the PFO adsorption model, it is believed that the adsorbate binds to the sorbent surface through physisorption, whereas chemisorption is the mechanism associated with a PSO model. The surface reactions that schematically show the attachment of sorbate to the surface for the PFO and PSO respectively, can be represented by the following equations (Largitte and Pasquier, 2016):



Equation 5 also depicts the kinetic mechanism taking place in accordance to the Elovich approach, although this model assumes sorbed ions interact via chemisorption with the solid surface and that adsorption rate decreases as surface coverage increases. Chemisorption implies the formation of a chemical bond due to the transfer or sharing of electrons between sorbate and sorbent. Physisorption involves weak electrostatic attraction forces and no modification of sorbent chemical structure. Therefore, to evaluate the importance of diffusion, it is necessary to resort to other models, such as the IP model.

From the analysis of the experimental results, it turned out that the strength of the linear relationships of the data distributions, as measured by the coefficient of determination, r^2 , yielded an acceptable value only when the linearized

form of the PSO model equation was used (figure 7), being 0.9992. This suggests that the process is governed by a second order reaction mechanism for which the general assumptions belonging to the PFO model apply. As mentioned above, it has been claimed that the fit of the data to a PSO

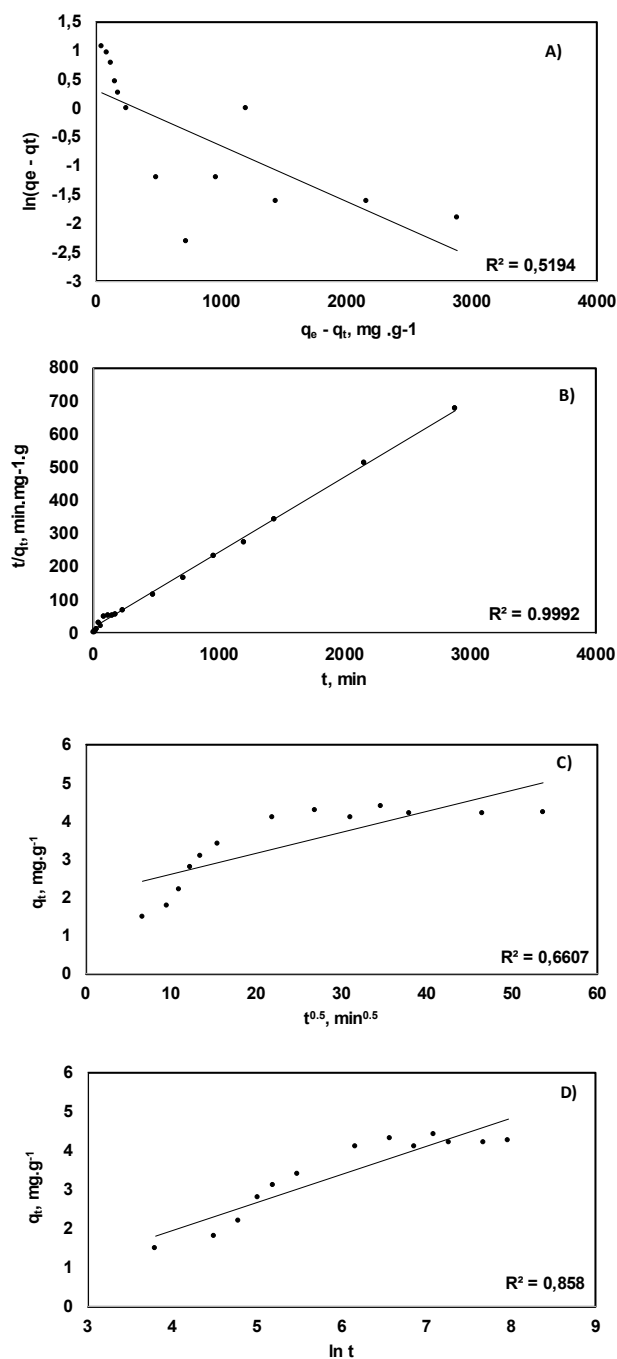


Figure 7. Charts showing the plotting of data derived from experimental results according to the linearized forms of the PSF order (A), PSO (B), IP (C), and Elovich (D) equations; straight lines obtained from linear regression analysis are also on view.

Figura 7. Distribución de los datos obtenidos a partir de los resultados experimentales según las formas linealizadas de las ecuaciones de pseudo-primer orden (A), pseudo-segundo orden (B), difusión intraparticular (C) y Elovich (D); las rectas obtenidas a partir de análisis de regresión lineal también se muestran.

model is indicative that chemisorption is the mechanism controlling adsorption; although this is not a generally accepted assessment and has been refuted by some researchers on the grounds that such a fact is not sufficient evidence of the formation of a chemical bond between sorbate and sorbent. Instead, initial concentration levels have been attributed a more decisive role in explaining the observed adsorption mechanisms; with the PSO process favored by low sorbate concentrations and PFO by high ones (Azizian, 2004).

Adjustment of data to the linearized form of the Elovich model yielded the second highest valued for r^2 , 0.858. Despite being lower than 0.9, which is considered a statically acceptable value to derive conclusions, this further corroborates, the presence of chemisorption as the main binding mechanism of sorbate to sorbent sorption. On what comes to the IP model, the low value of r^2 that was obtained can be in response to the mechanical stirring provided during the experiments, which eliminated the possibility of diffusion being the limiting stage in the adsorption process.

CONCLUSIONS

The chitosan-chabazite composite obtained and studied in this research showed to have the capacity of appreciably removing Eriochrome Black T colorant from water. Evidence shows that the mechanisms controlling the adsorption process fits a PSO model under the conditions prevailing during the experiments. This may be the result of the low initial dye concentration that was used and of the formation of bonds of chemical nature between sorbate and sorbent.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to kindly thank Dr. Ramón Alfonso Moreno Corral and Dr. Silvia Elena Burruel Ibarra, from the Department of Polymer and Materials Research at the University of Sonora, for their invaluable help in performing the UV-vis and SEM analyses, respectively.

REFERENCES

- Ahmad, M., Ahmed, S., Swami, B. and Ikram, S. 2015. Adsorption of heavy metals ions: role of chitosan and cellulose for water treatment. *International Journal of Pharmacognosy*. 2: 280-289.
- Álvarez, L., Valdez, R., García, R., Olivo, D., Garza, M., Meza, E. and Gortáez, P. 2015. Decolorization and biogas production by an anaerobic consortium: effect of different azo dyes and quinoid redox mediators. *Water Science and Technology*. 72: 794-801.
- An, J., Dultz, S. 2006. Adsorption of tannic acid on chitosan-montmorillonite as a function of pH and surface charge properties. *Applied Clay Science*. 36: 256-264.
- Attallah, O. A., Al-Ghobashy, M. A., Nebsen, M. and Salem, M. Y. 2016. Removal of cationic and anionic dyes from aqueous solution with magnetite/pectin and magnetite/silica/pectin hybrid nanocomposites: kinetic, isotherm and mechanism analysis. *RSC Advances*. 6: 11461-11480.

- Aysan, H., Edebalı, S., Ozdemir, C., Celik, M. and Karakaya, N. 2016. Use of chabazite, a natural abundant zeolite, for the investigation of the adsorption kinetics and mechanism of methylene blue dye. *Microporous and Mesoporous Materials*. 235: 78-86.
- Azizian, S. 2004. Kinetic models of sorption: a theoretical analysis. *Journal of Colloid and Interface Science*. 276: 47-52.
- Bailie, J.E., Hutchings, G.J. and O'Leary, S. 2001. Supported Catalyst. In *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*. K. H. J. Buschow, R. W. Cahn, M. C. Flemings, B. Ilshner, E. J. Kramer, S. Mahajan and P. Veysière (ed.), pp. 8986–8990. Elsevier, Oxford.
- Bashir, S., Teo, Y. Y., Ramesh, K. and Rizwan, M. 2019. Synthesis and Characterization of pH-sensitive N-succinyl chitosan hydrogel and its properties for biomedical applications. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 64: 4571-4574.
- Cestarolli, D., das Graças de Oliveira, A. and Guerra, E. 2019. Removal of eriochrome black textile dye from aqueous solution by combined electrocoagulation-electroflotation methodology. *Applied Water Science*. 9: 101.
- Dambies, L., Guimon, C., Yiacoumi, S. and Guibal, E. 2001. Characterization of metal ion interactions with chitosan by X-ray photoelectron spectroscopy. *Colloid Surface A*. 177: 203-214.
- Djelad, A., Morsli, A., Robitzer, M., Bengueddach, A., Di Renzo, F. and Quignard, F. 2016. Sorption of Cu(II) Ions on Chitosan-Zeolite X Composites: Impact on Gelling and Drying Conditions. *Molecules*. 21: 1 – 15.
- Dimowa, L., Piroeva, I., Atanasova, V., Rusew, R. and Shivachec, B. 2018. Structural peculiarities of natural chabazite modified by ZnCl₂ and NiCl₂. *Bulgarian Chemical Communications*. 50: 114-122.
- Escobar-Sierra, D., Ossa-Orozco, C., Quintana-Rodríguez, M. and Ospina-Villa, W. 2013. Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparzones de crustáceos. *Scientia et Technica*. 18: 260-266.
- Falk, M. 1984. The frequency of the H-O-H bending fundamental in solids and liquids. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*. 40: 43-48.
- Flores, A. 2015. Estudios de equilibrio de adsorción de fluoruros sobre compositos a base de quitosano. Masters dissertation. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí.
- Gürses, A., Acikyildiz, M., Günes, K. and Gürses, M. 2016. *Dyes and Pigments*. Springer. Switzerland.
- Ho, Y.S. and McKay, G. 1999. Pseudo-Second Order Model for Sorption Processes. *Process Biochemistry*. 34: 451-465.
- Kajjumba, G., Emik, S., Ongen, A., Kurtulus, H. and Aydin, S. 2018. Modelling of Adsorption Kinetic Processes – Errors, Theory and Application. At: *Advanced Sorption Process Applications*. Serpil Edebalı (ed.). IntechOpen Limited, London.
- Karimi, M., Mahdavinia, G., Massoumi, B., Baghban, A. and Saraei, M. 2018. Ionically crosslinked magnetic chitosan/k-carrageenan bioadsorbents for removal of anionic eriochrome black-T. *International Journal of Biological Macromolecules*. 113: 361-375.
- Khurana, I., Shaw, A., Bharti, Khurana, J. and Rai, P., 2018. Batch and dynamic adsorption of eriochrome black-T from water on magnetic graphene oxide: experimental and theoretical studies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 6: 468-477.
- Kumar, S., Prasad, K., Gil, J., Sobral, A. and Khon, J. 2018. Mesoporous zeolite-chitosan composite for enhanced capture and catalytic activity in chemical fixation of CO₂. *Carbohydrate Polymers*. 198: 401-406.
- Kyzas, G. and Bikiaris, D. 2015. Recent modifications of chitosan for adsorption applications: a critical and systematic review. *Marine Drugs*. 13: 312-337.
- Lagergren S. and Vetenskapsakademiens K. S. 1898. Zur theorie der sogenannten adsorption gelster stoffe. *Handlingar*. 24:1–39.
- Lakhan, R., Kumar, P. and Pratap, R. 2015. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes-a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 104: 21-31.
- Largitte, L. and Pasquier, R. 2016. A review of the kinetics adsorption models and their application to the adsorption of lead by an activated carbon. *Chemical Engineering Research and Design*. 109: 495-504.
- Li, J., Corma, A. and Yu, J. 2015. Synthesis of new zeolite structures. *Royal Society of Chemistry*. 44: 7112-7121.
- Lou, X. and Deng, F. 2018. *Nanomaterials for the removal of Pollutants and Resource reutilization*. 1st ed. Elsevier.
- Moeinpour, F., Alimoradi, A. and Kazemi, M. 2014. Efficient removal of eriochrome black-T from aqueous solution using NiFe₂O₄ magnetic nanoparticles. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 12:1
- Montalvo, S., Huiliñir, C., Borja, R., Sánchez, E. and Herrmann, C. 2020. Application of zeolites for biological treatment processes of solid wastes and wastewaters – A review. *Bioresource Technology*. 301: 1-10.
- Oladoja, N., Unuabonah, E., Amuda, O. and Kolawole, O. 2017. Operational principles and material requirements for coagulation/flocculation and adsorption-based water treatment operations. *Polysaccharides as a Green and Sustainable Resources for Water and Wastewater Treatment*. 1-11.
- Park, J., Wang, J., Tafti, N. and Delaune, R. 2018. Removal of eriochrome black T by sulfate radical generated from Fe-impregnated biochar/persulfate in fenton-like reaction. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*.
- Pérez, A., Díaz, P., Rangel, J., Cerino, F., Ovando, V. and Alcalá, J. 2016. Fluoride adsorption capacity of composites based on chitosan-zeolite-algae. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 15: 139-147.
- Pholosi, A., Naidoo, E. B. and Ofomaja, A. E. 2020. Intraparticle diffusion of Cr(VI) through biomass and magnetite coated biomass: A comparative kinetic and diffusion study. *South African Journal of Chemical Engineering*. 32: 39-55.
- Plazinski, W., Dziuba, J. and Rudzinski, W. 2013. Modeling of sorption kinetics: the pseudo-second order equation and the sorbate intraparticle diffusivity. *Adsorption*. 19: 1055-1064.

- Saha, T. K., Bhoumik, N. C., Karmaker, S., Ahmed, M. G., Ichikawa, H. and Fukumori, Y. 2010. Adsorption of Methyl Orange onto chitosan from aqueous solution. *Journal of Water Resource and Protection*. 2: 298-906.
- Szatkowski, T., Kołodziejczak-Radzimska, A., Zdarta, J., Szwarc-Rzepka, K., Paukšta, D., Wysokowski, M., Ehrlich, H. and Jesionowski, T. 2015. Synthesis and characterization of hydroxyapatite/chitosan composites. *Physicochemical Problems of Mineral Processing*. 51: 575-585.
- Taaca, K. L. M. and Vasquez, M. R. 2017. Fabrication of Ag-exchanged zeolite/chitosan composites and effects of plasma treatment. *Microporous and Mesoporous Materials*. 241: 383-291.
- Tran, V., Ngo, H., Guo, W., Zhang, J., Liang, S., Ton-That, C. and Zhang, X. 2015. Typical low-cost bio sorbents for adsorptive removal of specific organic pollutants from water. *Bioresource Technology*. 182: 353-363.
- Uddin, M. 2017. A review on the adsorption of heavy metals by clay minerals, with special focus on the past decade. *Chemical Engineering Journal*. 308: 438-462.



Bacterias endófitas y su efecto en la inducción de resistencia sistémica en el cultivo de frijol contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*

Endophytic bacteria and their effect on the induction of systemic resistance in bean crop against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*

Epifanio Castro-del Ángel, Francisco Daniel Hernández-Castillo*, Gabriel Gallegos-Morales, Yisa María Ochoa Fuentes

Departamento de Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila, México.

RESUMEN

El cultivo del frijol es afectado por diversas enfermedades en las que destaca la marchitez causada por *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* spp. El manejo de estos patógenos principalmente se realiza mediante el uso de compuestos químicos los cuales contaminan el ambiente, son tóxicos para el humano, desarrollan resistencia en los fitopatógenos y además aumentan los costos de producción. El objetivo del presente estudio fue evaluar la respuesta de inducción de resistencia mediante la inoculación de bacterias endófitas contra *R. solani* y *F. oxysporum*. Se utilizaron plantas de frijol de 45 días de edad para determinar la concentración de proteínas (PR) y la actividad de peroxidasa (POD), fenilalanina amonio liasa (PAL) a las 6, 12, y 24 h después de la inoculación de los consorcios. Los resultados evidenciaron que los microorganismos endofíticos promueven los mecanismos de defensa en frijol, pudiendo propiciar resistencia contra *F. oxysporum* y *R. solani*.

Palabras clave: proteínas, peroxidasa, fenilalanina amonio liasa, marchitez del frijol.

ABSTRACT

Various diseases affect the bean crop, notably the wilt caused by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium* spp. The management of these pathogens is mainly with the use of chemical compounds, all of which contribute to environmental pollution, are harmful to humans, phytopathogens develop resistance and increase production costs. The objective of this research was to evaluate the resistance induction response by inoculating endophytic bacteria against *R. solani* and *F. oxysporum*. Bean plants of 45 days old were utilized to determine PR protein concentration and the enzymatic activity of peroxidase (POD) and phenylalanine ammonia lyase (PAL) at 6, 12, and 24 h after consortia inoculation. The results showed that endophytic microorganisms have potential as inducers of defense mechanisms in beans, promoting resistance against *F. oxysporum* and *R. solani*.

Keywords: proteins, peroxidase, phenylalanine ammonium lyase, bean wilt disease.

INTRODUCCIÓN

Rhizoctonia solani Kühn (teleomorfo *Thanatephorus cucumeris*) y *Fusarium oxysporum* son importantes patógenos comunes de pudrición de la raíz y marchitez del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Oladzad *et al.*, 2019; Abd-El-Khair *et al.*, 2019). En los últimos años, el control biológico se ha convertido en una alternativa prometedora y ecológicamente amigable al control químico en el manejo de enfermedades de las plantas transmitidas por el suelo y se han introducido varios agentes de control biológico como posibles bio-fungicidas (Nasir *et al.*, 2018). Las bacterias endófitas son un grupo de microorganismos endosimbóticos diseminados entre las plantas; una asociación de plantas con bacterias endofíticas incluye una gran diversidad de taxones bacterianos y plantas hospedadoras (Tamosiune *et al.*, 2017). Investigaciones recientes han identificado especies bacterianas endofíticas y se ha informado cada vez más que reducen el crecimiento y la actividad de una plétora de fitopatógenos (Latha *et al.*, 2019). Las bacterias endofíticas pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo de la mejora del crecimiento de las plantas, la fitorremediación, la solubilización de fosfatos, la fijación de nitrógeno, la modulación del metabolismo de las plantas y la señalización de fitohormonas que conducen a la adaptación del estrés biótico/abiótico ambiental (Muthukumar *et al.*, 2017). Indirectamente, las bacterias endofíticas pueden mejorar la salud de las plantas al atacar las plagas y patógenos con antibióticos, enzimas hidrolíticas, limitación de nutrientes y cebar las defensas de las plantas. Para conferir estos beneficios, las bacterias deben colonizar la endosfera de la planta después de colonizar la rizosfera (Afzal *et al.*, 2019). La inducción de resistencia se asocia a las proteínas relacionadas con la patogenia (proteínas PR) como grupo de las proteínas antifúngicas relacionadas con la defensa inducibles más importantes, que incluyen defensinas, tioninas, proteínas similares a la osmotina, proteínas similares a la taumatina, quitinasas, glucanasas, oxalato oxidasa o proteínas similares a la oxalato oxidasa y proteínas de transferencia de lípidos (Moosa *et al.*, 2017). La fenilalanina amonio liasa (Phenylalanine ammonia-lyase; PAL) cataliza el primer paso en la vía biosintética del fenilpropanoide a través de la desaminación de la fenilalanina en ácido transcinámico, un precursor de las vías biosintéticas de la lignina y los flavonoides. (Jun *et al.*, 2018, Gho *et al.*, 2020). La PAL juega un efecto

*Autor para correspondencia: Francisco Daniel Hernández Castillo
 Correo electrónico: fdanielhc@hotmail.com

Recibido: 13 de mayo de 2021

Aceptado: 27 de junio de 2021

importante en la síntesis de metabolitos secundarios y el proceso de resistencia al estrés (Zhen y DeGang, 2017). Otro del grupo de enzimas importantes en la defensa de las plantas son las peroxidases; antioxidantes clave, están ampliamente distribuidas en la naturaleza y catalizan la oxidación de varios sustratos donantes de electrones concomitante con la descomposición del H₂O₂ (Pandey *et al.*, 2017). Gutiérrez-Martínez *et al.* (2020) reportan que la actividad enzimática en hojas de frijol, hubo un aumento en todas las concentraciones con cadmio y sugieren que podría deberse a la inducción de mecanismos de señalización sistemática provocados por el estrés oxidativo como medio de protección de las hojas. El aumento en las actividades de POD en peras inoculadas con *B. amyloliquefaciens* indican su capacidad para inducir la defensa bacteriana a través de enzimas relacionadas con la defensa (Pingping *et al.*, 2017). El objetivo del presente estudio fue evaluar la respuesta de inducción de resistencia mediante la inoculación de bacterias endófitas contra *R. solani* y *F. oxysporum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación de los hongos fitopatógenos

Se recolectaron plantas de frijol con síntomas de marchitez y necrosis de raíz y tallos por *Rhizoctonia solani* y *Fusarium sp.*, las raíces y tallos se lavaron con agua corriente, las cuales se secaron bajo campana de flujo laminar durante 12 horas. Se cortaron porciones de tejido sano y enfermo, y se desinfectaron externamente con hipoclorito de sodio al 3%, lavándose tres veces consecutivas con agua destilada estéril para eliminar el exceso de desinfectante. Posteriormente, se colocaron en toallas estériles para secarse. Los fragmentos de raíces y tallos fueron sembrados en medio de cultivo PDA (BD, Bioxon, Dickinson and Company, México) y se incubaron en una incubadora (Lumistel^{MR} IEC-41, México) a 26±2°C por siete días. *F. oxysporum* fue identificado fenotípicamente de acuerdo con las características morfológicas descritas por Leslie y Summerell (2006); la identificación de *R. solani* se determinó por los criterios de Sneh *et al.* (1991). Se utilizó el método de cultivos monospóricos para la purificación de *F. oxysporum* y punta de hifa para el caso de *R. solani*, los aislamientos fueron conservados bajo refrigeración en agar inclinado a 4 °C.

Corroboración molecular de los hongos

Extracción de ADN de los hongos

Cepas axénicas de los hongos desarrollados en medio de cultivo PDA de siete días de edad, se rasparon con la ayuda de una espátula para la obtención de micelio. La extracción fue realizada por el método de Nicholson *et al.* (2001), usando buffer que contenía EDTA 10 mM, Tris HCl 10 mM pH 8.0, SDS 0.5%. El ADN extraído fue resuspendido en 25 µL de TE. La integridad y calidad del ADN se verificó en gel de agarosa al 1%, bajo electroforesis horizontal aplicando un voltaje de 100 volts por 40 min.

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificó la región ITS1 e ITS4 (Internal Transcribed Spacer), mediante una mezcla de amplificación en volumen final de 20 µL, compuesto por 13.58 µL de agua MQ, 2.0µL de buffer MgCl (10X), 0.32µL de MgCl₂ (25mM), 0.4µL de dNTP's (10mM), 0.5µL de cada iniciador ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G3') e ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3') (10 µM), 0.5 µL de DMSO, 0.2 µL de ADN Taq-polimerasa 1 U y 1 µL de ADN (40 ng/µL). Las reacciones de amplificación se efectuaron usando un termociclador (Bio-Rad T100™ Thermal Cycler California USA) bajo el siguiente programa: 1 ciclo de 94 °C 3 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 45 s, 53 °C por 45 s y 72 °C 1 min; finalizando con un ciclo de polimerización de 72 °C por 7 min. Las bandas amplificadas se observaron en un gel de agarosa al 1.0% a 90 V por 60 min (Nicholson *et al.*, 2001).

Secuenciación de productos de PCR

Los productos de PCR fueron incrementados y purificados por medio de kit GeneAII[®]Expin[™] PCR SV, y se secuenciaron por el laboratorio MacroGen Online Sequencing Order System (Rockville, MD, United States), las secuencias obtenidas, se analizaron en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), usando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para secuencias altamente similares. Cada secuencia obtenida se le depuró la parte inicial y final para aumentar la sensibilidad del análisis (Castro del Ángel *et al.*, 2019).

Bacterias endófitas

Dos aislamientos de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa 53 y *B. amyloliquefaciens* cepa 21 fueron tomadas de la colección de microorganismos del laboratorio de Fitopatología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Con estos aislamientos se formaron dos consorcios: uno a una concentración de 1x10⁶ ufc y otro de 1x10⁸ ufc.

Formación de consorcios

Se determinó la compatibilidad entre las cepas que mostraron los niveles más altos de antagonismo y mantuvieron su acción continua sobre los fitopatógenos. La compatibilidad se realizó en placas de Petri considerando el antagonismo solo y combinado de las cepas de bacterias endófitas desarrollando la ecuación de Sueke *et al.* (2010), se consideró la siguiente expresión matemática: , donde: Efecto A= Efecto en A cuando es probado en combinación de B / Efecto en A solo y Efecto B= Efecto en B cuando es probado en combinación de a / Efecto en B solo. La aceptación del efecto fue a partir de los siguientes posibles resultados en la mezcla: ≤ 0.5, sinergismo; 0.5-1.0, aditivo; 1.0-4.0, indiferencia y > 4, antagonismo.

Microorganismos y condiciones de cultivo

El inóculo bacteriano se preparó con una asada de las cepas 21 y 53, ambas se cultivaron en medio líquido papa

dextrosa (PD) y se incubaron en un agitador rotatorio (Labnet, Orbit 1000, USA) a 120 rpm a 26 ± 2 °C durante siete días. Después de la incubación, las esporas se recuperaron mediante centrifugación en una centrifuga (Clay Adams Dynac II Centrifuge, United States) a 3500 rpm y se resuspendieron en agua destilada estéril; la suspensión se ajustó en una cámara de Neubauer, la concentración utilizada fue 1×10^6 ufc/mL y 1×10^8 ufc /mL. Las suspensiones de los endófitos se conservaron en refrigeración a 4 °C durante 24 h.

Los conidios de *F. oxysporum* se recuperaron raspando la placa de Petri y suspendiéndolos en 500 mL de agua destilada estéril, y finalmente se ajustó a 1×10^6 conidios/mL. El inóculo de *R. solani* se obtuvo mediante la metodología de Schneider *et al.* (1997) modificada; se colocaron 300 g de grano de trigo en matraces de 1000 mL con 100 mL de medio PD y se esterilizaron en autoclave durante 30 min por tres días consecutivos. Los matraces se inocularon con tres discos de 5 mm de diámetro con micelio del patógeno de siete días de edad, los cultivos se incubaron a 22 ± 2 °C durante 21 días.

Establecimiento del ensayo

Semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* CV. Pinto Saltillo) se sembraron en macetas de 5 Kg de capacidad con suelo pasteurizado, recolectado de parcelas donde anteriormente se había cultivado frijol, el método utilizado fue pasteurización que consistió someter el suelo a 80 °C en autoclave durante 3 veces consecutivas y dejando enfriar entre cada vez. Al momento de la siembra se realizó la inoculación de los fitopatógenos; para el caso de *F. oxysporum* con una suspensión de 1×10^6 conidios/mL; para *R. solani* 10 semillas de trigo con esclerocios y micelio de *R. solani* de 21 días de edad. Los tratamientos estudiados se reportan en la tabla 1. Los consorcios se inocularon tres veces: una al momento de la siembra, la segunda a los 25 días después de la emergencia y la tercera a los 45 días después de la emergencia. Es importante mencionar que los experimentos se establecieron por separado, es decir un ensayo para *F. oxysporum* y otro para *R. solani*. Los consorcios son una mezcla de especies de *Bacillus*: la diferencia entre estos consiste en dos niveles de inóculo en cada uno de ellos. El experimento se estableció en un diseño de bloques al azar bajo condiciones de invernadero con siete repeticiones por cada tratamiento, una maceta fue considerada una repetición que contó con dos plantas de frijol.

Determinación de actividad enzimática

El material vegetal utilizado para la extracción consistió en 1 g de hojas de frijol de 45 días de edad, previamente lavadas y secas, se maceraron en mortero con una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.3 0.1 M, relación 1:2 (m/v). Posteriormente las muestras se centrifugaron a 12 500 rpm durante 15 min a 4 °C, el sobrenadante fue separado para la determinación de la concentración de proteínas (PR), y actividad de fenilalanina amonio liasa (PAL) y peroxidasa (POD). La inoculación de los consorcios se realizó mediante aplicación a la raíz utilizando un aspersor manual (Truper 10929, México) de 1 L de capacidad y la inoculación de los

Tabla 1. Designación de tratamientos en el cultivo de frijol en condiciones de invernadero

Table 1. Treatments designation in bean crop under greenhouse conditions.

Código	Tratamiento	Concentración
Cons 1 + <i>F. oxysporum</i>	(T1) Patógeno + consorcio 1	1×10^6 ufc
Cons 2 + <i>F. oxysporum</i>	(T2) Patógeno + consorcio 2	1×10^8 ufc
Cons 1	(T3) Consorcio 1	1×10^6 ufc
Cons 2	(T4) Consorcio 2	1×10^8 ufc
Patógeno	(T5) <i>Fusarium oxysporum</i>	1×10^6 conidios/mL
Testigo	(T6) Testigo	Agua
Cons 1 + <i>R. solani</i>	(T1) Patógeno + consorcio 1	1×10^6 ufc
Cons 2 + <i>R. solani</i>	(T2) Patógeno + consorcio 2	1×10^8 ufc
Cons 1	(T3) Consorcio 1	1×10^6 ufc
Cons 2	(T4) Consorcio 2	1×10^8 ufc
Patógeno	(T5) <i>Rhizoctonia solani</i>	10 semillas de trigo/maceta
Testigo	(T6) Testigo	Agua

hongos fitopatógenos se llevó a cabo con una jeringa hipodérmica con aplicación de 25 mL al suelo (Castro del Ángel *et al.*, 2019). Las muestras se colectaron a las 0, 6, 12 y 24h después de la aplicación de los tratamientos, las muestras en el tiempo de 0 h fueron colectadas antes de la inoculación (González-Gallegos *et al.*, 2015), el ensayo se desarrolló por triplicado.

Cuantificación de proteínas (PR)

Se determinó según el método de Bradford, utilizando como patrón albúmina de suero bovino (Bradford, 1957). Para la preparación del reactivo Bradford. Se pesaron 10 mg de azul de Coomassie G-250, se adicionaron 5 mL de etanol al 95 % v/v y 10 mL de ácido fosfórico al 85% v/v y se aforó a 100 mL con agua destilada, esta solución se filtró con papel Whatman No. 2 y se almacenó en frasco ámbar a 4 °C.

Preparación de la solución concentrada de albúmina sérica bovina (BSA) 1000 µg/mL.

Se disolvieron 4 mg de BSA en 4 mL de agua destilada y se homogeneizó la solución. Después, se hizo una curva de calibración a partir de diferentes concentraciones de BSA, las soluciones se prepararon con concentración de 100-1000 µg/mL, a partir de BSA y agua destilada (Buffer), llevándolas a un volumen final 1 mL.

Determinación de proteínas por la técnica de Bradford

Se mezclaron en un tubo de vidrio 100 µL de cada una de las concentraciones de BSA con 5 mL de reactivo de Bradford, después de 5 minutos se realizó la lectura en el espectrofotómetro (Jenway 7305 Spectrophotometer, UK) a una longitud de onda de 595 nm, ajustando el cero de absorbancia con el blanco.

Partiendo de la Ley de Beer-Lambert, se realizó una curva ordenando en el eje X las concentraciones y en el eje Y las absorbancias, luego se realizó la regresión lineal y se obtuvo la ecuación $Y=mx+b$ y el R^2 .

Determinación de la actividad de fenilalanina amonoliasa (PAL)

Se tomaron 0.9 mL de L-Fenilalanina 1 mg/mL, se adicionó 0.1 mL de extracto enzimático e incubó a 40°C durante 30 min en un termociclador (Bio-Rad T100™ Thermal Cycler, California USA) a 300 rpm. La reacción se detuvo con 0.25 mL de ácido clorhídrico 5 N. Las muestras se colocaron en baño de hielo y se les adicionó 5 mL de agua destilada. Los valores de absorbancia se determinaron a una $\lambda = 290$ nm en un espectrofotómetro (Jenway 7305 Spectrophotometer, UK) y se calculó con un coeficiente de extinción molar de 17.4/mM/cm (Trotel *et al.*, 2007). Una unidad de actividad enzimática se definió como equivalente a la producción de 1 μ mol de ácido transcinámico producido por minuto por mg de proteína (Rodríguez *et al.*, 2006).

Determinación de la actividad de peroxidasa (POD)

El ensayo fue realizado en un espectrofotómetro (Jenway 7305 Spectrophotometer, UK) a 610 nm usando rojo de fenol como sustrato, el volumen total de la reacción fue de 1 mL a 37°C. A 20 μ L del extracto enzimático se le adicionaron 50 μ L de rojo de fenol al 0.2% (m/v), 930 μ L de solución amortiguadora de citrato de sodio pH 4.2, 50 mM. La reacción dió inicio con 10 μ L de peróxido de hidrogeno 1 mM, dejando transcurrir 3 min, para detener la reacción se adicionaron 40 μ L de hidróxido de sodio 2 N. La absorbancia se registró a 610 nm y se calculó con un coeficiente de extinción molar de 22 000 M/cm, para el producto oxidado. Se expresó la actividad de peroxidasa como milimoles de rojo de fenol que se oxidan por gramo de tejido fresco por minuto (Yedidia *et al.*, 1999).

Análisis estadístico

Las medias obtenidas de la concentración de proteína y de la actividad enzimática fueron sometidas a un análisis de varianza y prueba de separación de medias por el método de prueba de rangos múltiples de Tukey al 0.05 de significancia en el programa SAS versión 9.0 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación de los hongos fitopatógenos

Las cepas de hongos aisladas de plantas de frijol con síntomas de marchitez y pudrición de raíz fueron identificadas por características morfológicas. Se observó micelio algodonoso con tonos púrpuras a partir de los cuatro días de edad, las características microscópicas fueron microconidios sin septos, ovales, elípticos a reniformes (Khan *et al.*, 2021). Las clamidosporas de posición intercalar y terminal, individualmente o en pares, con una apariencia lisa circular de doble pared. Las macroconidias observadas eran fusoides y alantoides con tres a cinco septos y en forma de gancho (Figura 1A) las características observadas corresponden a

versal cerca de la unión, estas características corresponden a las reportadas por (Sneh *et al.*, 1991 y Al-Fadhil *et al.*, 2019), se pueden observar en la Figura 1B.

Corroboración molecular de los hongos

La confirmación de la identificación morfológica de las especies se obtuvo mediante secuenciación de la región intergénica ITS1 e ITS4, las secuencias obtenidas comparadas en BLAST dieron como resultado a *Fusarium oxysporum* con clave de acceso JN624887, máximo score de 915, y *Rhizoctonia solani* con clave de acceso JX050236.1 y máximo score

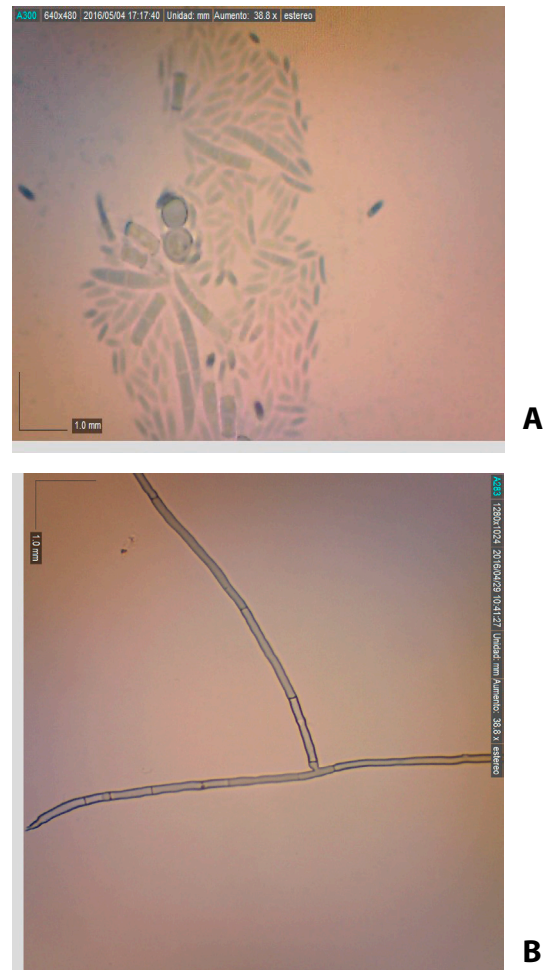


Figura 1. Estructuras morfológicas de *Fusarium oxysporum* desarrollado en medio clavel agar (A) y crecimiento de *Rhizoctonia solani* en medio PDA (B).

Figure 1. Morphological structures of *Fusarium oxysporum* grown on carnation agar medium (A) and *Rhizoctonia solani* grown on PDA medium (B).

las reportadas por Leslie y Summerell (2006) para *Fusarium oxysporum*. Las características consideradas para la identificación de *Rhizoctonia solani* fueron observadas como micelio incoloro a los primeros 3 días de desarrollo, pero se volvió amarillento a color marrón claro a las dos semanas de edad, con células alargadas y ramificaciones que crecieron en ángulos aproximadamente rectos a la hifa principal, estaban ligeramente constreñidos en la unión, y con una pared trans-

de 1216, ambas con 99% de identidad (Tabla 2). Singha *et al.* (2016) identificaron molecularmente aislados de *Fusarium* amplificando la región del espaciador transcrito interno (ITS) del ADN ribosómico conservado utilizando los cebadores ITS1 e ITS4. Todas las secuencias de ITS se compararon en busca de espacios y similitudes. Por otra parte, Basbagci *et al.* (2019) identificó aislamientos de *R. solani* morfológicamente y los corroboró mediante secuenciación de la región ITS1 e ITS4 a partir de ADN genómico.

Tabla 2. Claves de accesos de la corroboración molecular de las cepas fúngicas.

Table 2. Access codes of the molecular corroboration of the fungal strains.

Cepa	NCBI	Código de acceso
<i>F. oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> strain Af/8/1	JN624887
<i>R. solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> isolate JZB-34	JX050236.1

Formación de los consorcios

La evaluación en cultivo dual permitió conocer que entre las cepas de bacterias endófitas no existió antagonismo entre ellas al evaluarlas simultáneamente sobre los hongos en estudio (Figura 2). El efecto combinado de *B. amyloliquefaciens* cepa 53 y *B. amyloliquefaciens* cepa 21 contra *F. oxysporum* fue de 2.06 mientras que para *R. solani* fue de 1.98, de acuerdo con Sueke *et al.* (2010) el efecto encontrado fue nulo, es decir no existió antagonismo, ni sinergismo entre cepas, sin embargo, fueron seleccionadas para ser evaluadas en el cultivo de frijol en diferente tamaño de inóculo. En otro contexto, Yanti *et al.* (2021), reportan consorcios de *Bacillus* como inductores del crecimiento vegetal en el cultivo de tomate, al respecto, estos autores seleccionaron los consorcios más prometedores por métodos cualitativos observando la zona de inhibición entre ellos en presencia de *Sclerotium rolfsii*.

Determinación de actividad enzimática

Los tratamientos indujeron la actividad proteica de los sistemas ensayados. La actividad mostrada en plantas de frijol, con respuesta a *F. oxysporum* y *R. solani* se ve incrementada a partir de las 6 h en todos los tratamientos, mostrando una tendencia a disminuir con el paso de las horas. Las

plantas con exposición directa a *F. oxysporum* muestran los valores más altos de proteína, sin embargo la exposición del consorcio 2 no presenta diferencia significativa frente a este. A las doce horas las plantas inoculadas con los consorcios 1 y 2 e inoculados simultáneamente con *F. oxysporum* muestran la actividad más alta en comparación con el tratamiento individual de *F. oxysporum* ($P < 0.0001$), lo que demuestra que se está expresando la respuesta de defensa de la planta frente al patógeno por la acción de los consorcios bacterianos aplicados. Por otra parte, las plantas coinoculadas con el consorcio 2 y el patógeno, se mantiene la actividad constante desde las 6 h y hasta las 24 h mientras que el consorcio 1 la actividad declina a partir de la 12 h de estudio. Los consorcios 1 y 2 en ausencia del patógeno también inducen la actividad proteica en comparación al testigo absoluto ($P < 0.0001$). La actividad de proteína debe formar parte del mecanismo de defensa de la planta de frijol, y es la responsable de la inducción de resistencia desarrollada por la planta después del tratamiento con los consorcios y la infección por el patógeno. La inducción de resistencia se asocia a las proteínas relacionadas con la patogenia (proteínas PR) como grupo de las proteínas antifúngicas relacionadas con la defensa inducibles más importantes, que incluyen defensinas, tioninas, proteínas similares a la osomtina, proteínas similares a la taumatina, quitinasas, glucanasas, oxalato oxidasa u proteínas similares a la oxalato oxidasa y proteínas de transferencia de lípidos (Moosa *et al.*, 2017). La inducción y acumulación de proteínas PR protegen a las plantas de futuras infecciones, su activación es muy importante, ya que son un componente indispensable de las respuestas inmunitarias innatas en plantas en condiciones de estrés biótico o abiótico (Jain y Khurana, 2018).

Determinación de la actividad enzimática de PAL

Los mayores niveles de actividad se expresaron en las plantas tratadas con los consorcios 1 y 2 en presencia de *F. oxysporum* a los diferentes tiempos de muestreo ($P < 0.0001$), por ello se puede considerar que los consorcios estimulan la defensa de la planta ante al patógeno encontrándose los valores más significativos en los tratamientos antes mencionados. El incremento en la actividad de PAL de la vía de los fenilpropanoides aumenta la producción de ácido transcinámico a partir de fenilalanina, el cual es transformado a través

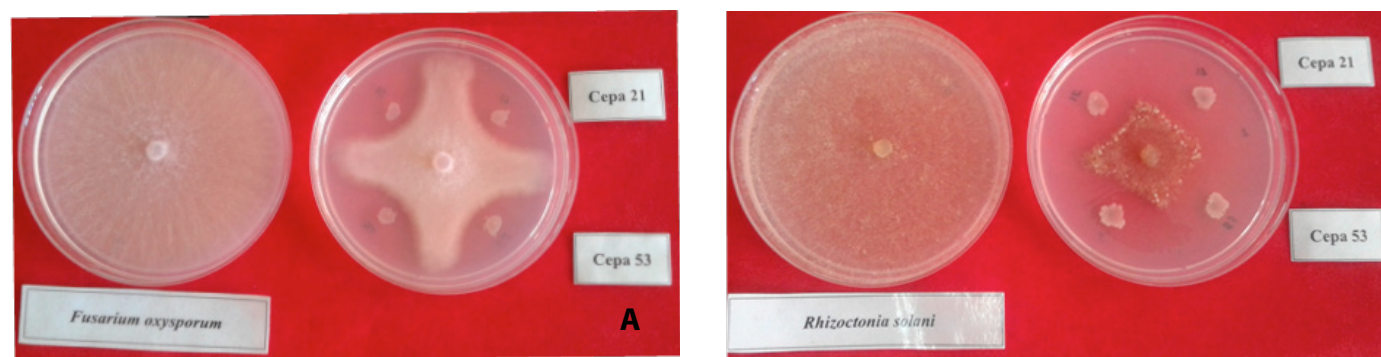


Figura 2. Inhibición *in vitro* de *Fusarium oxysporum* (A) y *Rhizoctonia solani* desarrollado en medio PDA (B).
Figure 2. *In vitro* inhibition of *Fusarium oxysporum* (A) and *Rhizoctonia solani* grown in PDA medium (B).

de otras dos reacciones enzimáticas hasta paracumaril CoA; precursor de un amplio grupo de productos que incluyen la lignina, los fenilpropanos y los flavonoides (Glas *et al.*, 2012). Ardila *et al.* (2007) reportaron que la actividad PAL se activa a partir de las 6 h postinoculación de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* raza 2 en plantas de clavel, encontrándose los picos máximos a las 12 h y disminuyó a las 24 h, sin embargo, en este ensayo los valores más altos de PAL se obtuvieron hasta las 24h. Al respecto Duba *et al.* (2019) reportaron que la actividad PAL inmediatamente y 24 h después de la inoculación, en líneas de trigo evaluadas fue significativamente ($p \leq 0.01$) mayor en plantas inoculadas con *F. culmorum*. Singh *et al.* (2020) con inoculaciones de *Trichoderma asperellum* y ácido ascórbico en semillas de tomate, las plantas tratadas mostraron una mayor acumulación de contenido total de fenol y una mayor actividad PAL, POD, quitinasa y polifenol oxidasa en comparación con las plantas no tratadas. En otro apartado, la determinación de PAL en plantas de frijol contra *R. solani*; en todos los tratamientos existe incremento en la actividad enzimática desde las 6 h hasta las 24 h en comparación con el testigo. Se encontró que los consorcios 1 y 2 sin inoculación del patógeno, son mayores que el testigo libre de cualquier tratamiento, lo que se relaciona con un posible cambio en la activación de mecanismos de defensa que generan los consorcios aplicados sobre plantas de frijol antes de que se inocule el patógeno. La capacidad de los hongos patógenos para inducir resistencia sistémica está determinada por la actividad de la fenilalanina amonio liasa, relacionada con el metabolismo de los compuestos fenólicos, la vía metabólica de las fitoalexinas y la inducción de la síntesis de ácido salicílico (SA). En la vía de biosíntesis de SA, el ácido cinámico se convierte en SA a través de la fenilalanina. El ácido cinámico se convierte en productos intermedios de PAL y luego se convierte en SA. El ácido salicílico es un mensajero secundario en el proceso de inducir resistencia al estrés biótico en las plantas (Barna *et al.*, 2012). La PAL cataliza el primer paso en la vía biosintética del fenilpropanoide a través de la desaminación de la fenilalanina en ácido transcinámico, un precursor de las vías biosintéticas de la lignina y los flavonoides. (Jun *et al.*, 2018, Gho *et al.*, 2020). La PAL juega un efecto importante en la síntesis de metabolitos secundarios y el proceso de resistencia al estrés (Zhen y DeGang, 2017). Por su parte, Rais *et al.* (2017) estudiaron rizobacterias para la inducción de diferentes vías en plantas de arroz a través de la producción de varios metabolitos. Reportan, que *Bacillus* spp. inducen enzimas como la superóxido dismutasa, peroxidasa, polifenol oxidasa y fenilalanina amonio-liasa contra la infección por *Pyricularia oryzae*. Como se observa en este trabajo, la inducción de esta enzima por los consorcios puede ser relevante en los mecanismos de defensa de las plantas de frijol a las enfermedades.

Determinación de la actividad enzimática de POD.

La expresión de la actividad de POD en plantas de *P. vulgaris* no presenta diferencias significativas ante los diferentes tratamientos que se aplicaron, en los diferentes

tiempos a los que se realizó el ensayo. Sin embargo, a las 12 y 24 h de muestreo las plantas tratadas con los consorcios en ausencia de *R. solani* presentan mayor actividad de POD en comparación a las plantas sin ningún tratamiento. En adición se puede observar que a las 6 h el testigo absoluto presenta aumento en la actividad POD, pero el incremento de la actividad peroxidasa, que se detecta en las plantas libres de cualquier tratamiento, es posiblemente debido al efecto de la herida que se hace, pues dicha actividad no progresa a través del tiempo. Por otra parte, Ezziyyani *et al.* (2005) reportan que a las 24 y 96 horas postaplicación, se produce un incremento de actividad peroxidasa y que la actividad aumenta con el tiempo posterior a la inoculación. La mayor actividad se da a las 96 h en plantas tratadas con *T. harzianum*. Por lo tanto, Shoaib *et al.* (2019) asumen que la supresión de *Sclerotium rolfsii* está directamente relacionada con el aumento de la actividad de las enzimas peroxidasa, catalasa, polifenol oxidasa y fenilalanina amonio liasa, por lo que proporciona la base para la resistencia en garbanzo. En otro contexto, Khanna *et al.* (2019) sugieren que los aspectos favorables de *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia gladioli* en la modulación de las características de crecimiento y la expresión de defensa antioxidante de *Lycopersicon esculentum* para enfrentar el estrés oxidativo generado bajo la infección por nemátodos. A su vez, Sahni y Prasad (2020) indican que *Pseudomonas* sp. y vermicomposta aplicadas simultáneamente las actividades de las enzimas POD y PAL fueron altas en las plantas de garbanzo después de inocularse con *S. rolfsii*. Sus actividades máximas aparecieron a las 48 h después de la exposición al patógeno.

CONCLUSIONES

Se identificó a *F. oxysporum* y *R. solani* como agentes causales de marchitez y pudrición de raíz de frijol variedad Pinto Saltillo. Los consorcios de bacterias endófitas provocaron un aumento en la concentración de proteínas y actividad enzimática en el cultivo de frijol, como mecanismo de defensa contra *F. oxysporum* y *R. solani* a partir de las 6 horas bajo condiciones de invernadero. La mayor actividad de PAL aumenta significativamente a las 24 h postinoculación, por lo que la PAL contribuye al mecanismo de resistencia del frijol al aumentar su actividad después de la inoculación con los consorcios bacterianos. Como estudios posteriores se pretende trabajar con más tiempos de exposición de los tratamientos y más muestreos de actividad enzimática y así mismo determinar otras enzimas implicadas en la defensa vegetal por la vía de resistencia sistémica inducida.

REFERENCIAS

- Abd-El-Khair, H., Elshahawy, I.E., Haggag, H.E.K. 2019. Field application of *Trichoderma* spp. combined with thiophanate-methyl for controlling *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* in dry bean. Bulletin of the National Research Centre. 43(1): 1-9. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0062-5>

- Al-Fadhil, F.A., AL-Abedy, A.N., Alkhafije, D.A. 2019. Isolation and molecular identification of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.) and their control feasibility by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. Egyptian Journal of Biological Pest Control. 29(47):1-11. <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0145-5>
- Ardila, H., Baquero, B., Martínez, S. 2007. Inducción de la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa en clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) por elicitors del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2. Revista Colombiana de Química. 36(2): 151-167. Disponible en: https://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28042007000200002&lng=en&nrm=iso
- Afzal, I., Shinwari, Z.K., Sikandar, S., Shahzad, S. 2019. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. Microbiological Research. 221:36-49. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- Barna, B.; Fodor, J.; Harrach, B.D.; Pogány, M.; Király, Z. 2012. The Janus face of reactive oxygen species in resistance and susceptibility of plants to necrotrophic and biotrophic pathogens. Plant Physiology Biochemistry. 59:37-43. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.01.014>
- Basbagci, G., Unal, F., Uysal, A., Dolar, F.S. 2019. Identification and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* AG-4 causing root rot on chickpea in Turkey. Spanish Journal of Agricultural Research. 17(2) e1007:1-12. <https://doi.org/10.5424/sjar/2019172-13789>
- Bradford. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Castro del Ángel, E., Hernández Castillo, F. D., Gallegos Morales, G., Ochoa Fuentes, Y. M., Castillo Reyes, F. 2019. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* with endophytic bacteria formulations and its effect in the growth promotion in bean crop. *Revista Bio Ciencias* 6 (e416). 1-13. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e416>
- Duba, A., Goriewa-Duba, K., Wachowska, U., Głowacka, K., Wiwart, M. 2019. The associations between leaf morphology, phenylalanine ammonia lyase activity, reactive oxygen species, and *Fusarium* resistance in selected species of wheat with different ploidy levels. *Plants*. 8: 360: 1-19. <https://doi.org/10.3390/plants8100360>
- Ezziyyani, M., Requena, M. E. y Candela, M. E. 2005. Producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) tratadas con *Trichoderma harzianum*. *Anales de Biología*. 27: 143-153. Disponible en: <https://revistas.um.es/analesbio/article/view/29941>
- González-Gallegos, E., Laredo-Alcalá, E., Ascacio-Valdés, J., Jasso de Rodríguez, D., Daniel Hernández-Castillo, F.D. 2015. Changes in the production of salicylic and jasmonic acid in potato plants (*Solanum tuberosum*) as response to foliar application of biotic and abiotic inductors. *American Journal of Plant Sciences*. 6(11): 1785-1791. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.611179>
- Gutiérrez-Martínez, P.B., Torres-Morán, M.I., Romero-Puertas, M.C., Casas-Soles, J., Zarazúa-Villaseñor, P. Sandoval-Pinto, E., Ramírez-Hernández, B.C. 2020. Assessment of antioxidant enzymes in leaves and roots of *Phaseolus vulgaris* plants under cadmium stress. *Biotecnica*. 22(2):110-118. <https://doi.org/10.18633/biotecnica.v22i2.1252>
- Gho, Y.S., Kim, S.j., Jung, K.H. 2020. Phenylalanine ammonia-lyase family is closely associated with response to phosphate deficiency in rice. *Genes and Genomics*. 42:67-76. <https://doi.org/10.1007/s13258-019-00879-7>
- Glas, J.J., Schimmel, B.C.J., Alba, J.M., Escobar, B. R., Schuurink, R.C., Kant, M.R. 2012. Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. *International Journal of Molecules Sciences*.13 (12):17077-17103. <https://doi.org/10.3390/ijms131217077>
- Jain, D., Khurana J.P. 2018. Role of Pathogenesis-Related (PR) Proteins in plant defense mechanism. In: Singh A., Singh I. (eds) *Molecular aspects of plant-pathogen interaction*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_12
- Jun, S-Y., Sattler, S.A., Cortez, G.S., Vermerris, W., Sattler, S.E., Kang, CH. 2018. Biochemical and structural analysis of substrate specificity of a Phenylalanine Ammonia-Lyase. *Plant Physiology*. 176(2). 1452-1468. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01608>
- Khan, M.A., Khan, S.A., Waheed, U., Raheel, M., Khan, Z., Alrefaei, A.F., Alkhamis, H.H. 2021. Morphological and genetic characterization of *Fusarium oxysporum* and its management using weed extracts in cotton. *Journal of King Saud University -Science*. 33(101299):1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.101299>
- Khanna, K., Jamwal, V.L., Kohli, S.K. Gandhi, S.G., Ohri, P., Bhardwaj, R., Wijaya, L., Alymeni, M.N. Ahmad, P. 2019. Role of plant growth promoting bacteria (PGPRs) as biocontrol agents of *Meloidogyne incognita* through improved plant defense of *Lycopersicon esculentum*. *Plant and Soil*. 436:325-345. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-03932-2>
- Latha, P., Karthikeyan, M., Rajeswari, E. 2019. Endophytic bacteria: Prospects and applications for the plant disease management. In: Ansari, R., Mahmood, I. (eds) *Plant Health Under Biotic Stress*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6040-4_1
- Leslie, J. F., Summerell, B. A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. Kansas Agricultural Experiment Station, Manhattan. 388p.
- Moosa, A., Farzand, A., Sahi, S.T., Khan, S.A. 2017. Transgenic expression of antifungal pathogenesis-related proteins against phytopathogenic fungi—15 years of success. *Israel Journal of Plant Science*. 32(1-2):38-54. <https://doi.org/10.1080/07929978.2017.1288407>
- Muthukumar, A., Udhayakumar, R., Naveenkumar, R. 2017. Role of bacterial endophytes in plant disease control. In: Maheshwari, D., Annapurna, K. (eds) *Endophytes: crop productivity and protection*. Sustainable Development and Biodiversity. 16. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66544-3_7
- Nasir, H. A., Abbasi, S., Sharifi, R., Jamali, S. 2018. The effect of biocontrol agents consortia against *Rhizoctonia* root rot of common bean *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Crop Protection*. 7(1):73-85 URL: <http://jcp.modares.ac.ir/article-3-4575-en.html>
- Nicholson T. P., Rudd B. A.M., Dawson M., Lazarus C.M., Simpson T.J., Cox R.X. 2001. Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases. *Chemistry and Biology*. 8:157-178. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(00\)90064-4](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(00)90064-4)

- Oladzad, A., Zitnick-Anderson, K., Jain, S., Simons, K., Osorno, J. M., McClean, P. E., Pasche, J. S. 2019. Genotypes and genomic regions associated with *Rhizoctonia solani* resistance in common bean. *Frontiers in Plant Science*, 10:1-14 <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00956>
- Pandey, V.P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., Dwivedi, U.N. 2017. A Comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*. 6(1):1-16. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000308>
- Pingping, S., Jianchao, C., Xiaohui, J., Wenhui, W. 2017. Isolation and characterization of *Bacillus Amyloliquefaciens* L-1 for biocontrol of pear ring rot. *Horticultural Plant Journal*. 3(5): 183-189. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.10.004>
- Rais, A., Jabeen, Z., Shair, F., Hafeez, F.Y., Hassan, M.N. 2017. *Bacillus* spp., a bio-control agent enhances the activity of antioxidant defense enzymes in rice against *Pyricularia oryzae*. *PLoS ONE*. 12(11) e0187412:1.17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187412>
- Rodríguez, P.A.T., Ramírez, A.M.A. y Cárdenas, T.R.M. 2006. Efecto de la quitosana en la inducción de la actividad de enzimas relacionadas con la defensa y protección de plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.) contra *Pyricularia grisea* Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24 (1): 1-7. Disponible en: <http://www.redalyc.org>
- Sahni, S., Prasad, B.D. Management of collar rot disease using vermicompost and a PGPR strain *Pseudomonas* sp. and their effect on defense-related enzymes in chickpea. 2020. *Indian Phytopathology*. 73: 301-311. <https://doi.org/10.1007/s42360-020-00203-4>
- Singha, I.M., Kakoty, Y., Unni, B.G., Das, J., Kalita, M.C. 2016. Identification and characterization of *Fusarium* sp. using ITS and RAPD causing fusarium wilt of tomato isolated from Assam, North East India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 14(1): 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.07.001>
- Sneh, B., Burpee, L., Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. *American Phytopathological Society*, St. Paul, MN, USA. 133 p.
- Shoab, A., Shezad, A., Javaid, A., Akhtar, S., Awan, Z.A. 2019. Evaluation of biocontrol strategies and its synergistic interaction permitting the chickpea plant to trigger the appropriate defense responses against *Sclerotium rolfsii*. *Biologia (Lahore, Pakistan)*. 65(2):329-334.
- Singh, P., Singh, J., Ray, S., Rajput, R. S., Vaishnav, A., Singh, R. K., Singh, H. B. 2020. Seed biopriming with antagonistic microbes and ascorbic acid induce resistance in tomato against Fusarium wilt. *Microbiological Research*. 237 (126482). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126482>
- Tamosiune, I., Baniulis, D., Stanys, V. 2017. Role of endophytic bacteria in stress Tolerance of agricultural plants: Diversity of microorganisms and molecular mechanisms. In: Kumar, V., Kumar, M., Sharma, S., Prasad, R. (eds) *Probiotics in Agroecosystem*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4059-7_1
- Trotel, A. P., Couderchet M., Biagianni S., Aziz, A. 2007. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany*. 64: 21-32. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.12.009>
- Yanti, Y., Hamid, H., Yaharwandi, R. 2021. Biological control of *Sclerotium rolfsii* on tomato seedlings using *Bacillus* spp. consortium. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 741(012063): 1-5. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/741/1/012063>
- Yedidia, N. Benhamou & I. Chet. 1999. Induction of defense responses in Cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzanium*. *Applied Environmental Microbiology*. 65(3):1061-1070. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.1061-1070.1999>
- Zhen, H.X., DeGang, Z. 2017. Research progress in regulation and control mechanism of phenylalanine ammonia lyase in plants. *Guizhou Agricultural Sciences*. 45 (4):16-20. URL : [http://www.gznykx.org.cn/Jweb_gznykx/...](http://www.gznykx.org.cn/Jweb_gznykx/)