

Detección y caracterización cinética de una contaminación por *Candida tropicalis* durante la producción de levadura forrajera

Roxana García Gutiérrez¹, Miguel Ángel Otero Rambla¹,
Norka Fundora Toucet¹, Aidín Martínez Sánchez¹, Gustavo Saura Lauria¹ y
Laurence Casalot²

¹Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), La Habana, Cuba;
²Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR 180 "Microbiologie et Biotechnologie des
Environnements Chauds", ESIL, Marseille, France

Resumen

Se identificó a *Candida tropicalis* como el agente causal de una severa contaminación detectada en la producción de levadura forrajera en una fábrica de la región oriental de Cuba. Posteriormente a un detallado diagnóstico en las materias primas y diferentes secciones de la fábrica con el objetivo de identificar el foco y aislar el microorganismo contaminante, se procedió a su identificación mediante comparación de secuencias nucleotídicas de las regiones adyacentes no codificadoras ITS (*internal transcribed spacer*) ITS1 e ITS4 del ADN ribosomal (ADN_{rib}) 5,8S. En paralelo, se simuló la multiplicación celular de la cepa de producción, *Candida utilis* NRRL Y-660, a volumen de laboratorio (2,5 l), observándose los mismos efectos negativos detectados a nivel industrial sobre su comportamiento cinético al conducir un cultivo en condiciones aerobias con melazas contaminadas. La identificación y caracterización cinética primaria permitió la adopción de medidas higiénico-sanitarias y de carácter tecnológico restableciéndose la producción a la vez que se adoptó una metodología para la vigilancia profiláctica de futuras contaminaciones.

Palabras clave

Candida tropicalis, *Candida utilis*, Levadura forrajera, ADN_{rib} 5,8S, Región ITS1-ITS2

Detection and kinetic characterization of *Candida tropicalis* contamination during fodder yeast production

Summary

Candida tropicalis was identified as the etiologic agent of a severe contamination detected on an industrial fodder yeast production at the Cuban eastern region. After a detailed diagnostic task on raw material carried out on different factory's sections, protocols to identify the contamination source and to isolate the microorganism were proposed. The identification was by comparison of the internal transcribed spacers ITS1 and ITS4 from 5.8S ribosomal DNA nucleotide sequences. In parallel, propagation of production strain, *Candida utilis* NRRL Y-660, at lab scale (2.5 l) was performed. Similar results to those observed in the factory concerning to its kinetic behavior in aerobic propagation with contaminated molasses, were detected at this level. The identification and primary kinetic characterization led to the implementation of sanitary and technological measures to bring production at its normal operational conditions as well as the application of prophylactic surveillance methodologies to avoid future contaminations.

Key words

Candida tropicalis, *Candida utilis*, Fodder yeast, DNARib 5.8S, ITS1-ITS2 region

Dirección para correspondencia:

Sra. Roxana García Gutiérrez
Departamento de Microbiología
Instituto Cubano de Investigaciones de los
Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)
Apartado Postal 4026, La Habana, Cuba
Tel.: +537 557 015 / 006; Fax: +537 988 243
E-mail: roxana.garcia@icidca.edu.cu

Aceptado para publicación el 9 de septiembre de 2005

En Cuba las plantas de producción de levadura forrajera (*Candida utilis*) operan habitualmente en modo continuo, condiciones sépticas y emplean como fuente de carbono y energía mezclas de vinazas de destilería y melazas. En verano cuando las temperaturas ambientales alcanzan valores superiores a 30 °C, se desarrollan microorganismos contaminantes durante las etapas de propagación originando serios problemas en el proceso.

El presente artículo describe un diagnóstico detallado realizado en una fábrica de levadura forrajera ubicada en la región oriental de Cuba. Dicha instalación enfrentaba serios problemas operacionales durante los meses de julio y agosto, debido a una contaminación en los fermentadores que impedía obtener la calidad adecuada en el producto final.

Con el objetivo de conocer la extensión del problema, la localización del foco de contaminación, así como el aislamiento e identificación del agente causal se desarrollaron una serie de análisis microbiológicos en varios ecosistemas de la fábrica de azúcar, para finalmente proponer soluciones inmediatas y comenzar la producción nuevamente bajo condiciones operacionales óptimas.

Material y métodos

Muestras y microorganismos empleados. Se analizaron muestras procedentes de diferentes entornos de las fábricas de levadura y azúcar. Como controles se evaluaron melazas procedentes de una fábrica de azúcar aledaña, así como el agua de proceso. Para estudios cinéticos en reactores de 2,5 l se empleó la cepa de producción *C. utilis* NRRL Y-660. Se obtuvieron los amplicones ITS1-ITS4 de las cepas contaminantes NO₄, NO₅ y NO₇, aisladas del jugo primario de caña de azúcar, así como para los aislamientos NO₁ y A', obtenidos a partir de muestras provenientes de jugo mezclado de caña de azúcar y de un reactor para producción de levadura forrajera respectivamente. Los fragmentos amplificados fueron transformados sobre *Escherichia coli* J109 (Promega, EE.UU.) para secuenciar.

Estudios cinéticos. Se propagó *C. utilis* NRRL Y-660 en modo discontinuo en reactor de 2,5 l sobre melaza contaminada con un contenido de azúcares reductores totales (ART) 20 g/l, (NH₄)₂HPO₄ 0,78 g/l, (NH₄)₂SO₄ 3,5 g/l; pH 4. La temperatura se ajustó a 35 °C bajo un régimen de aireación durante toda la corrida de 1 l de aire por litro de medio por minuto (vvm). En todos los casos se siguió el comportamiento de la biomasa (X) y los azúcares cada hora, calculando finalmente la tasa máxima de crecimiento (μ_{\max}) y el coeficiente de rendimiento (Y_{xs}).

Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de ADN. A partir del ADN extraído de cultivos puros de los aislamientos A', NO₁, NO₄, NO₅ y NO₇, mediante el Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), se realizó la reacción de amplificación empleando los cebadores directo ITS1 y reverso ITS4 en termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2004. La *Taq* polimerasa y soluciones tampón fueron suministrados por Promega.

La secuenciación automatizada se realizó a partir de células *E. coli* J109 (Promega), transformadas con el vector pGEM®-T Easy Vector System I (Promega) conteniendo el amplicón ITS1-ITS4 de los aislamientos A', NO₁ y NO₄. La secuencia del ADN amplificado fue obtenida mediante la técnica de Sanger (Genome Express, Francia). Las secuencias fueron alineadas y comparadas en la base de datos del National Center for Biotechno-

logy Information (NCBI, EE.UU.) empleando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

Resultados

Descripción morfológica del microorganismo contaminante. Se observaron estructuras y agrupaciones celulares no características de *C. utilis* en muestras colectadas de los fermentadores, tanques de almacenamiento de melazas y el prefermentador de la destilería, así como en otras secciones de la fábrica de azúcar como es la de descarga de las centrífugas de azúcar de tercera (semilla) y su entorno ambiental. Las células mostraron una gran variedad morfológica, con abundante proporción de pseudomicelios ramificados irregularmente, ostentando blastosporas globosas y ovoides en cadenas simples o ramificadas.

Las colonias crecidas a partir de muestras colectadas variaron en cuanto a su textura desde suave o membranosa finamente granulada hasta parcialmente reticuladas o agrietadas y con proyecciones filamentosas en los cultivos más viejos.

Estas características coincidieron con las apreciadas en los cultivos aislados A', NO₁, NO₄, NO₅ y NO₇. La melaza control y agua de proceso no mostraron la presencia de la morfología celular y estructural descrita.

Evaluación de parámetros cinéticos. Se realizaron estudios a nivel de reactor de 2,5 l para analizar las condiciones de aparición del contaminante en las melazas infectadas; observándose que a partir de una determinada etapa del cultivo, el contaminante comenzaba a prevalecer y aparecían cada vez más células de *C. utilis* muertas en el reactor. Las determinaciones de la μ_{\max} e Y_{xs} del cultivo en desarrollo arrojaron valores de 0,302 h⁻¹ y 0,434 % respectivamente, valores significativamente inferiores a los tradicionales obtenidos para esta cepa sobre melazas y que fueron corroborados al fermentar sobre la melaza control: μ_{\max} = 0,330 h⁻¹ y Y_{xs} = 0,468 %.

La figura 1 muestra una comparación entre las dos melazas fermentadas, se evidencia que el control ofrece un substrato significativamente superior a los efectos de mayor conteo de levaduras y viabilidad de *C. utilis* en el cultivo. Es de destacar que en ambos casos, solo las células de *C. utilis* NRRL Y-660 son contabilizadas.

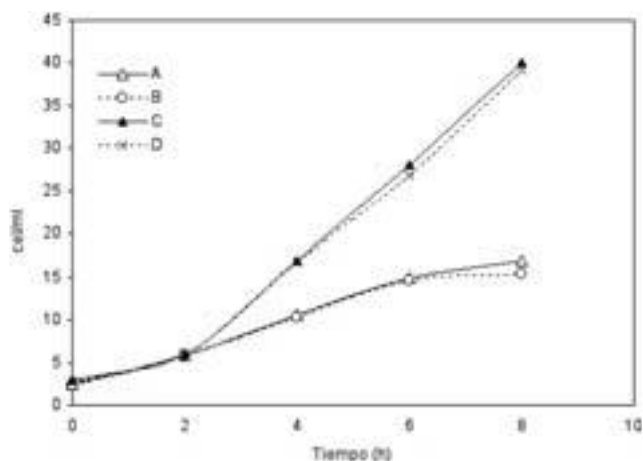


Figura 1. Multiplicación celular de *C. utilis* NRRL-Y-660 en melaza contaminada y control. Temperatura: 35 °C; pH 4,5; aire 1 vvm. A: Células totales en melaza contaminada; B: Células viables en melaza contaminada; C: Células totales en melaza control; D: Células viables en melaza control.

Establecimiento de una composición de medio de fermentación alternativo a la melaza. Durante el período de contaminación en la fábrica, la levadura se producía en esta instalación a partir de una mezcla de vinazas de destilería-melazas de 80:20 (expresado en términos de Demanda Química de Oxígeno, DQO), actuando la melaza solo como portador de nutrientes ausentes en las vinazas y estas como fuente de Carbono mayoritaria.

Al detectarse que las instalaciones de almacenamiento y trasiego de melazas en la fábrica constituían el principal foco infeccioso, con elevados niveles de contaminación que impedían el cultivo industrial estable de *C. utilis*, se decidió sustituir las melazas y formular un medio de producción alternativo. Se realizaron fermentaciones con mezclas de vinazas y nutriente de levadura [9] en pequeñas proporciones, lo cual permitió obviar los problemas de contaminación de las melazas y al mismo tiempo brindar una solución económicamente viable si se compara con los precios de las melazas en el mercado mundial.

La figura 2 muestra el crecimiento en modo discontinuo de la levadura *C. utilis* de producción en un medio conteniendo vinazas de destilería 70 g/l DQO y 0,03 g/l de nutriente de levadura 3 kg/t levadura seca. La $\mu_{\text{máx}}$ de la cepa de producción en este medio de vinazas, resultó particularmente elevada ($0,39 \text{ h}^{-1}$) y superior a cualquiera de las mezclas vinazas-melazas ensayadas con anterioridad [7].

Identificación del microorganismo contaminante.

La tabla 1 presenta las secuencias de la región del ADN-*rib* ITS1-5.8S-ITS2 para los aislamientos A¹, NO₁ y NO₄ procedentes de diferentes ecosistemas dentro de la fábrica de azúcar. Estas cepas fueron identificadas taxonómicamente como *Candida tropicalis* con porcentajes de identidad del 99% al ser comparados un número de pares de bases representativo en su secuencia (aproximadamente 520 pb), con otros pertenecientes a la base de datos NCBI.

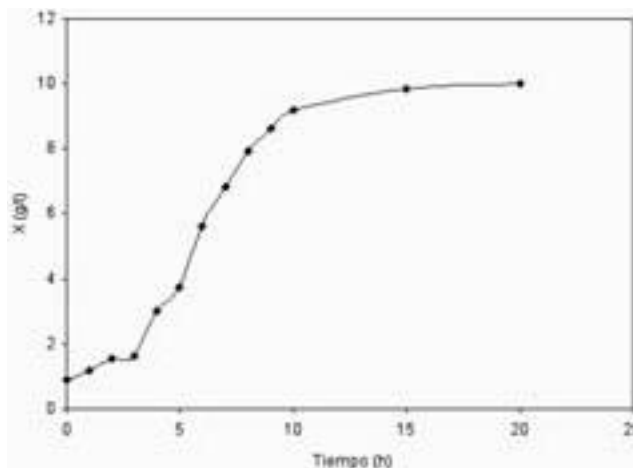


Figura 2. Crecimiento de *C. utilis* NRRL Y-660 sobre vinazas de destilería suplementadas con nutriente de levadura 0,03 g/l. Temperatura: 37 °C, pH 4, aire 1 vvm.

Aunque los aislamientos NO₅ y NO₇ no llegaron a ser identificados por secuenciación, sí mostraron patrones de bandas similares respecto al tamaño aproximado de los productos PCR ITS1/ITS4 (550-600 pb) junto con la morfología celular y cultural cercanos filogenéticamente a la especie *C. tropicalis*.

Discusión

C. tropicalis comparte el grupo de homologías de las especies *Candida albicans* y *Candida parapsilosis* [5,6,10,11] reportadas como las especies pertenecientes a este género de mayor interés clínico, por poseer estructu-

Tabla 1. Secuencias nucleotídicas de regiones ADN-*rib* ITS1-5.8S-ITS2 obtenidas por amplificación por PCR con cebadores ITS1/ITS4.

| Aislamiento | Secuencia de la región del ADN- <i>rib</i> ITS1-5.8S-ITS2 |
|-----------------|--|
| NO ₄ | 5'-GATTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGTCAAAGTTATGAAATAAATTGTGGTGGCCACTAGCAAATAAGCGTTTTGGATAAACCTAAGTCGCTTAAAT AAGTTTCCACGTTAAATCTTTCAAACAACTAGCGTATTGCTCAACACCAAACCCGAGGGTTGAG GGAGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGCGCAATGTGCGTTCAAAGA TCGATGATTCACGAATATCTGCAATTCATATTACGTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCG GAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGACTATTGTAATAATAAATCAAGTTTGACTGTAAATA AAAAGTTTGGTTAGTTATAACCTCTGGCGGTGGGATTGCTCCCGCCACCAAAGAAATTTGTTCAATA AAAAACACATGTGGTGCAATTAAGCAAATCAGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAATC-3' |
| A ¹ | 5'-GATTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGTCAAAGTTATGAAATAAATTGTGGTGGCCACTAGCAAATAAGCGTTTTGGATAAACCTAAGTCGCTTAAAT AAGTTTCCACGTTAAATCTTTCAAACAACTAGCGTATTGCTCAACACCAAACCCGAGGGTTGAG GGAGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGCGCAATGTGCGTTCAAAGA TCGATGATTCACGAATATCTGCAATTCATATTACGTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCG GAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGACTATTGTAATAATAAATCAAGTTTGACTGTAAATA AAAAGTTTGGTTAGTTATAACCTCTGGCGGTGGGATTGCTCCCGCCACCAAAGAAATTTGTTCAAT AAAAACACATGTGGTGCAATTAAGCAAATCAGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAATC-3' |
| NO ₁ | 5'-GATTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTTGAGGTCAAAGTTATGAAATAAATTGTGGTGGCCACTAGCAAATAAGCGTTTTGGATAAACCTAAGTCGCTTAAAT AAGTTTCCACGTTAAATCTTTCAAACAACTAGCGTATTGCTCAACACCAAACCCGAGGGTTGAG GGGAGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGCGCAATGTGCGTTCAAAG TCCGATGATTCACGAATATCTGCAATTCATATTACGTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCG AGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGACTATTGTAATAATAAATCAAGTTTGACTGTAAAT AAAAGTTTGGTTAGTTATAACCTCTGGCGGTGGGATTGCTCCCGCCACCAAAGAAATTTGTTCAAT AAAAACACATGTGGTGCAATTAAGCAAATCAGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAATC-3' |

ras celulares muy resistentes a tratamientos físico-químicos con modificaciones para la colonización de tejidos animales [8], lo cual las convierte en agentes de infecciones oportunistas por excelencia. Muchos autores sitúan a esta especie secundando a *C. albicans*, de acuerdo a su morbilidad en candidemias [1,3,4,11], por tanto la presencia de este patógeno en productos biotecnológicos destinados al consumo animal constituye un riesgo microbiológico inadmisiblemente.

A pesar de que la especie de producción *C. utilis* presenta una ubicación taxonómica diferente [5], *C. tropicalis* puede mostrar una apariencia celular muy próxima dependiendo de su estadio fisiológico y ciclo vital. Este hecho puede enmascarar el control de pureza de la cepa de producción por simple observación microscópica, afectando cinéticamente la multiplicación celular de *C. utilis* y conduciendo la producción hacia una paulatina pero inexorable sustitución del cultivo, como fue observado en las instalaciones tanto de la industria como a escala de laboratorio. Estos enmascaramientos morfológicos han sido reportados entre varias especies de este género formadoras de tubos germinativos y blastosporas [2] y en muchos casos el análisis de la secuencia nucleotídica en estos aislamientos ha resuelto discrepancias en el análisis fenotípico.

El diagnóstico microbiológico en varios entornos de la instalación, detectando el agente causal de la contaminación, su origen, rutas y puntos críticos, permitió la inmediata adopción de medidas higiénico-sanitarias. Se procedió a realizar limpiezas físicas seguidas de profundas limpiezas químicas en equipos, superficies y áreas de trabajo mediante pulverizaciones a presión con detergente ligeramente alcalino. Posteriormente se implementaron ciclos de desinfecciones con vapor de agua a presión, sosa cáustica (2%) y agua caliente.

Quedó establecida una metodología de vigilancia y desinfección profiláctica para tanques de almacenamiento de melazas cada 90 días o antes de comenzar después de un período de interrupción de la producción por más de tres días, en fermentadores cada vez que se vaciaran y antes de utilizarlos.

La implementación del medio de producción alternativo con vinazas y nutriente de levadura, además de eliminar la fuente originaria de la contaminación levaduriforme, contribuyó a disminuir el alto gravamen asociado a las melazas como materia prima (4,5 Tm miel final / Tm levadura seca) y sus altos costos energéticos; aminorando a su vez de forma decisiva la contaminación ambiental generada por la destilería aledaña. El análisis de las características físicas y composición química de *C. utilis* obtenida con vinazas de destilerías no mostró variabilidad significativa en cuanto a contenido de proteína bruta, fósforo, lípidos y carbohidratos totales, al comparar con levadura de melaza [9].

La identificación de C. tropicalis fue realizada en el laboratorio de Microbiología del IRD Marsella, Francia, gracias a la financiación otorgada por esta institución.

Bibliografía

1. Buscemi L, Arechavala A, Negroni R. Estudio de las vulvovaginitis agudas en pacientes adultas, sexualmente activas, con especial referencia a la candidiasis, en pacientes del hospital de infecciosas Francisco J. Muñiz. *Rev Iberoam Micol* 2004; 21: 177-181.
2. Chen Y, Eisner JD, Kattar M, Rassouljian-Barrett S, La-Fe K, Yarfitz S, Limaye A, Cookson B. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the Internal Transcribed Spacer region of the rRNA genes. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2302-2310.
3. Dawson NL, Robles HA, Alvarez S. Recurrent *Candida tropicalis* meningitis. *Clin Neurol Neurosurg* 2005; 107: 243-245.
4. Kucukates E, Erturan Z, Susever S, Yegenoglu Y. In vitro susceptibility of yeasts isolated from patients in intensive care units to fluconazole and amphotericin B during a 3-year period. *APMIS* 2005; 113: 278-283.
5. Lott T, Burns B, Zancope-Olivera R, Elie C, Reiss E. Sequence analysis of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) from yeast species within the genus *Candida*. *Curr Microbiol* 1998; 36: 63-69.
6. Lott TJ, Kuykendall RJ, Reiss E. Nucleotide sequence analysis of the 5.8S rDNA and adjacent ITS2 region of *Candida albicans* and related species. *Yeast* 1993; 11: 1199-1206.
7. Martínez JA, Almazán OA, Saura G, Otero MA. Production of fodder yeast from stillage in Cuba-an environmental approach. *Zucker Industrie* 2004; 129: 92-95.
8. Pfaller M, Wenzel R. Impact of the changing epidemiology of fungal infection in the 1990s. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 287-291.
9. Saura G, Otero MA, Martínez JA, Fundora N, Reyes E, Vasallo MC, Almazán OA. Propagation of yeast biomass from distillery wastes. Process and product evaluation. *Int Sugar J* 2003; 105: 38-43.
10. Spencer JFT, Spencer DM. Ecology: The bad guys: Pathogens of humans and other animals. En: Spencer JFT, Spencer DM (Eds.) *Yeasts in natural and artificial habitats*. Berlin, Springer-Verlag, 1997: 59-67.
11. Trama JP, Mordechai E, Adelson ME. Detection and identification of *Candida* species associated with *Candida* vaginitis by real-time PCR and pyrosequencing. *Mol Cell Probes* 2005; 19: 145-152.