

Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas  
Departamento de Ciencias Biológicas



Trabajo de Tesis Doctoral

**“Alimentos funcionales: Obtención de un producto  
probiótico para aves a partir de suero de quesería  
fermentado con microorganismos de kefir”**

*Lic. Alejandra Londero*

*Directora: Dra. Analía G. Abraham*

*Co-directora: Dra. Graciela L. Garrote*

- 2012 -

El presente trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), UNLP-CONICET.



## **Agradecimientos**

A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata, por haberme otorgado la formación que me permitió la realización de este trabajo y a la Facultad de Ciencias Exactas, por haberme permitido realizar mis estudios de postgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por otorgarme las becas que me permitieron llevar a cabo este trabajo.

A la Dra. Noemí Zaritzky por haberme permitido desarrollar este trabajo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA).

A Ricardo Quinta y a Rui Sereno por haberme dado la oportunidad de trabajar en Controlvet pero sobre todo por su cálida atención y su admirable generosidad.

A Graciela De Antoni por haberme integrado a su equipo de trabajo.

A Pablo Pérez, Andrea Gómez-Zavaglia, Graciela De Antoni, Patricio de Urraza, María Serradell, Analía Abraham y Graciela Garrote por haberme participado en los proyectos que financiaron este trabajo. Y porque, gracias a su empeño y a sus valores personales, han constituido no sólo un sólido equipo de trabajo sino además un grupo humano fundado en la solidaridad y el respeto.

A mis directoras por su haberme guiado con dedicación y compromiso durante el desarrollo y la escritura de este trabajo. Por su cariño, aliento y apoyo en todo momento. A Grace por haberme acompañado en cada paso transmitiéndome confianza y tranquilidad y a Analía por levantarme siempre el ánimo con su optimismo.

Especialmente a todos y a cada uno de mis compañeros de trabajo por su permanente disposición a colaborar y a compartir conocimientos. Por su invaluable ayuda y por hacer placentero el trabajo cotidiano.

A Pablo por haberme introducido al aprendizaje práctico de la microbiología con tanta consideración, respeto, paciencia y minuciosidad. Por ser tan buen compañero y por haberse tomado el trabajo de revisarme hasta las comas de la tesis.

A Judith por estar siempre dispuesta a ayudar, por darme confianza, por sus consejos y por ser un ejemplo.

A Fernanda y a Ángela por haber sido compañeras fieles en los más arduos momentos de trabajo en el laboratorio.

A Marina y a Carito por las revisiones de la tesis.

A Nachito, a Cami y a Yani por su compañía durante la escritura de la tesis.

A mis padres por su apoyarme siempre y no dejarme jamás bajar los brazos.

A mi hermana Eli, por haber sido siempre un ejemplo a seguir y por su confianza en mí.

A mi hermanita Ju por iluminar cada día de mi vida con su alegría, sostenerme con su fortaleza y por sobre todas las cosas por estar incondicionalmente a mi lado.

A mi tía Tata por haberme ayudado a corregir la bibliografía.

A Mariana por su ayuda con el diseño y por ser una amiga de hierro.

A Gabi por haber sido mi más fuerte punto de apoyo, por su compañía y cariño incondicional.

A todos aquellos que me ofrecieron ayuda y de alguna manera estuvieron cerca durante la escritura de este trabajo.



## ÍNDICE

### INTRODUCCIÓN GENERAL

---

<b>1.</b>	<b>El suero</b>	<b>1</b>
1.1	Valorización del suero	2
1.2	Procesos y productos	3
1.3	Propiedades funcionales de componentes del suero	5
1.4	Producción de suero en la Argentina	6
<b>2.</b>	<b>Alimentos funcionales en aves: Probióticos</b>	<b>7</b>
2.1	Conceptos generales	7
2.2	Microbiota intestinal y su rol en la salud	10
2.3	Productos probióticos y su aplicación	12
2.4	Mecanismos de acción de los probióticos	15
2.5	Consideraciones para la administración de los probióticos	19
2.6	Marco legal	22
<b>3.</b>	<b>Enfermedades causadas por enteropatógenos en aves</b>	<b>24</b>
3.1	Salmonelosis	25
3.2	Mecanismos de patogénesis de <i>Salmonella</i>	27
3.3	Métodos de control de salmonelosis en aves	29
3.4	Probióticos para el control de <i>Salmonella</i> en aves	32
<b>4.</b>	<b>Uso de antimicrobianos en la conservación de pienso para aves</b>	<b>34</b>
4.1	Contaminación de pienso	34
4.2	Métodos de control de microorganismos en el pienso	35
4.3	Uso de bacterias ácido lácticas y sus metabolitos como conservantes de pienso	37
<b>5.</b>	<b>El kefir</b>	<b>39</b>
5.1	Descripción del producto	39
5.2	Propiedades funcionales	43
5.3	Fermentación de suero con gránulos de kefir	45
	<b>Objetivos</b>	<b>49</b>

## CAPÍTULO 1. CARACTERIZACIÓN DE SUEROS FERMENTADOS CON GRÁNULOS O MICROORGANISMOS DE KEFIR

---

<b>Introducción</b>	51
<b>Objetivos</b>	52
<b>Materiales y métodos</b>	53
1. Sueros de quesería y medios de cultivo	53
2. Obtención de leche y suero fermentados con gránulos de kefir	53
3. Obtención de suero fermentado empleando otros cultivos iniciadores ( <i>starters</i> )	53
3.1 Empleo de cultivos madre como <i>starters</i>	53
3.1.1 Cultivo madre en suero	53
3.1.2 Cultivo madre en leche	54
3.2 Empleo de cepas aisladas de kefir como <i>starters</i>	54
4. Aumento de biomasa de gránulos de kefir	55
5. Análisis de la composición química de gránulos de kefir y productos fermentados	55
5.1 Determinación de humedad	55
5.2 Determinación de cenizas	55
5.3 Análisis de minerales	55
5.4 Determinación de azúcares	56
5.5 Determinación del contenido de lactosa	56
5.6 Determinación del contenido de proteínas totales	56
5.7 Determinación de lípidos	57
6. Cinéticas de acidificación y producción de ácidos orgánicos	57
7. Enumeración de microorganismos viables	58
8. Microscopía electrónica de barrido (MEB)	58
9. Extracción de ADN	59
9.1 Extracción de ADN de gránulos de kefir	59
9.2 Extracción de ADN de productos fermentados	60

9.3	Extracción de ADN de cepas de referencia	61
10.	Amplificación mediante reacción de polimerización en cadena (PCR)	61
11.	Análisis por electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE)	62
12.	Identificación de bandas DGGE	63
	<b>Resultados y discusión</b>	65
1.	Fermentación de suero con gránulos de kefir	65
1.1	Similitud de gránulos de kefir crecidos en leche y suero	65
1.2	Análisis de leche y suero fermentados con gránulos de kefir	79
2.	Efecto de la variación del porcentaje de gránulos de kefir inoculados, el tipo de suero y la temperatura de incubación	85
2.1	Fermentación de suero con distintos porcentajes de gránulos de kefir	85
2.2	Empleo de distintos sueros como sustrato	90
2.3	Fermentación de suero a distintas temperaturas	93
2.3.1	Gránulos de kefir en suero a distintas temperaturas	94
2.3.2	Caracterización de suero fermentado con gránulos de kefir a diferentes temperaturas	98
3.	Fermentación de suero con cultivos iniciadores alternativos	105
3.1	Fermentación de suero con cultivos madre en suero y en leche	105
3.2	Fermentación de suero con microorganismos aislados de kefir	109
3.2.1	Crecimiento de los microorganismos en suero en cultivos puros y mixtos	110
3.2.2	Acidificación de suero y producción de ácidos orgánicos	112
	<b>Conclusiones</b>	115

## **CAPÍTULO 2. EFECTO INHIBITORIO DE SUERO FERMENTADO CONTRA PATÓGENOS INTESTINALES: ENSAYOS *IN VITRO***

---

	<b>Introducción</b>	117
	<b>Objetivos</b>	118
	<b>Materiales y métodos</b>	119
1.	Bacterias patógenas	119

2.	Reducción de la concentración de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella</i> Enteritidis en suero por fermentación con gránulos de kefir	119
3.	Preparación de sobrenadantes	120
4.	Ensayo de inhibición por difusión en agar	120
5.	Determinación de la concentración inhibitoria y bactericida mínima	121
6.	Efecto de los sobrenadantes de suero fermentado con gránulos de kefir sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella</i> Enteritidis	121
7.	Efecto de los sobrenadantes de suero fermentado con cepas aisladas kefir sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella</i> Enteritidis	122
8.	Supervivencia de patógenos en sobrenadantes de suero fermentado	122
	<b>Resultados y discusión</b>	123
1.	Reducción de la concentración de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella</i> Enteritidis en suero por fermentación con gránulos de kefir	123
2.	Inhibición de <i>Salmonella</i> Enteritidis y <i>E. coli</i> por sobrenadantes de suero fermentado	126
2.1	Ensayo de difusión en agar	126
2.2	Concentración inhibitoria y bactericida mínima	130
2.3	Cinéticas de crecimiento de <i>Salmonella</i> Enteritidis y <i>Escherichia coli</i> en presencia de distintas concentraciones de sobrenadante de suero fermentado	132
2.4	Curvas de muerte de <i>Salmonella</i> Enteritidis y <i>Escherichia coli</i> en sobrenadante de suero fermentado	133
2.5	Efecto inhibitorio de sobrenadantes de suero fermentado con <i>Lactobacillus kefir</i> CIDCA 8348, <i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 8327 y <i>Kluyveromyces marxianus</i> CIDCA 8154 sobre <i>Salmonella</i> Enteritidis y <i>Escherichia coli</i>	137
	<b>Conclusiones</b>	141

### **CAPÍTULO 3. ANTAGONISMO DEL SUERO FERMENTADO SOBRE LA ADHESIÓN E INVASIÓN DE *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR. ENTERITIDIS EN MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

---

<b>Introducción</b>	143
<b>Objetivos</b>	144
<b>Materiales y métodos</b>	145
1. Cultivo de células Caco-2/TC7	145
2. Ensayo de adhesión de microorganismos de kefir a células <i>in vitro</i>	146
3. Ensayos de asociación e invasión de <i>Salmonella</i> Enteritidis a células Caco-2/TC7	146
4. Efecto de los microorganismos de kefir sobre la asociación e invasión de <i>Salmonella</i> Enteritidis a células Caco-2/TC7	148
4.1 Preincubación de la monocapa celular con microorganismos de kefir	148
4.2 Preincubación de <i>Salmonella</i> Enteritidis con microorganismos de kefir	149
4.3 Preincubación de <i>Salmonella</i> Enteritidis con sobrenadantes de suero fermentado	149
5. Técnicas de microscopía	150
5.1 Tinción de May Grünwald Giemsa	150
5.2 Marcación fluorescente del citoesqueleto con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC).	150
5.3 Microscopía electrónica de barrido	151
6. Ensayos <i>in vivo</i>	151
6.1 Animales de laboratorio y bioterios	151
6.2 Productos administrados	152
6.3 Preparación del inóculo del patógeno	153
6.4 Protocolos experimentales	153
6.5 Traslocación de <i>Salmonella</i> Enteritidis a bazo e hígado	158
6.6 Determinación del contenido de <i>Salmonella</i> en heces	159
6.7 Análisis de la microbiota intestinal por electroforesis en gel con gradiente desnaturizante	159

6.8	Análisis estadístico	160
	<b>Resultados y discusión</b>	
	<b>PARTE A: Antagonismo de suero fermentado sobre la adhesión e invasión de <i>Salmonella</i> Enteritidis en modelos <i>in vitro</i></b>	161
1.	Asociación e invasión de <i>Salmonella</i> Enteritidis a células Caco-2/TC7	161
2.	Adhesión de los microorganismos de kefir a células Caco2/TC7	166
3.	Efecto de la presencia de microorganismos de kefir sobre la asociación e invasión de <i>Salmonella</i> Enteritidis a células Caco-2/TC7	170
3.1	Preincubación de la monocapa de enterocitos con microorganismos de kefir	170
3.2	Preincubación de <i>Salmonella</i> Enteritidis con microorganismos de kefir	172
4.	Efecto de los sobrenadantes de suero fermentado sobre la asociación e invasión de <i>Salmonella</i> Enteritidis a células Caco-2/TC7	181
	<b>PARTE B: Antagonismo de suero fermentado sobre la adhesión e invasión de <i>Salmonella</i> Enteritidis en modelos <i>in vivo</i></b>	187
1.	Inocuidad del suero fermentado sobre pollos parrilleros	187
2.	Análisis de la microbiota intestinal por electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)	192
3.	Antagonismo del suero fermentado sobre la asociación e invasión intestinal de <i>Salmonella</i> Enteritidis	197
3.1	Efecto de la administración de una dosis controlada de suero fermentado	198
3.2	Efecto de la administración de suero fermentado <i>ad libitum</i>	201
	<b>Conclusiones</b>	207

---

## CAPÍTULO 4. BIOCONSERVACIÓN DE PIENSO PARA AVES POR ADICIÓN DE SUERO FERMENTADO

	<b>Introducción</b>	209
	<b>Objetivos</b>	211
	<b>Materiales y métodos</b>	212
1.	Hongos	212
2.	Preparación de la solución de esporas	212

3.	Inhibición de la germinación conidial por sobrenadantes de suero fermentado	213
4.	Adición del suero fermentado al alimento	213
4.1	Preparación del alimento adicionado	213
4.2	Supervivencia del probiótico en el alimento	214
4.3	Resistencia del alimento a la contaminación fúngica	214
<b>Resultados y discusión</b>		215
1.	Inhibición de la germinación conidial por sobrenadantes de suero fermentado	215
2.	Adición de suero fermentado al alimento para su conservación	221
2.1	Supervivencia de bacterias ácido lácticas y levaduras en el alimento balanceado	222
2.2	Resistencia a la contaminación fúngica	224
<b>Conclusiones</b>		229
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>		231
<b>APÉNDICE</b>		233
1.	Medios de cultivo	233
2.	Buffers y reactivos	236
3.	Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante: reactivos, preparación de geles y tinción	238
3.1	Reactivos	238
3.2	Preparación de los geles y siembra	239
3.3	Tinción	240
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		241

# Introducción general





## 1. El suero

De acuerdo al Código Alimentario Argentino, con la denominación de sueros de lechería se entiende a “los líquidos formados por parte de los componentes de la leche, que resultan de diversos procesos de elaboración de productos lácteos, por ejemplo de quesos, de manteca, de caseína o de ricota”. También se define como el líquido remanente de la coagulación de las caseínas de la leche mediante la acción de quimosinas (cuajo) o ácidos minerales u orgánicos y su posterior remoción (Guimarães y col., 2010).

Una comparación del análisis químico de leche de vaca y suero de leche se presenta en la Tabla 1. Este análisis revela que alrededor del 50 % de los sólidos de leche permanecen en el suero, junto con prácticamente el 100 % de la lactosa y alrededor del 20 % de la proteína. La lactosa constituye una alta proporción (> 75 %) de los sólidos de suero y contribuye en gran parte a que el suero sea considerado uno de los alimentos más contaminantes del medio ambiente debido a que su demanda bioquímica de oxígeno es mayor a 35000 ppm y la demanda química de oxígeno supera las 60000 ppm (González Siso, 1996).

**Tabla 1:** Análisis químico comparativo de leche y suero<sup>a</sup> bovinos

	Componentes % p/v	
	Leche	Suero
Caseínas	2.8	<0.1
Proteínas de suero <sup>b</sup>	0.7	0.7
Lípidos	3.7	0.1
Cenizas	0.7	0.5
Lactosa	4.9	4.9
Sólidos totales	12.8	6.3

<sup>a</sup> Smithers y col. (1996).

<sup>b</sup> Las proteínas del suero comprenden ~50%  $\beta$ -lactoglobulina, ~20%  $\alpha$ -lactoalbúmina, ~15% glicomacropéptidos (solo en suero de cuajo), ~15% de proteínas y péptidos minoritarios (ej. inmunoglobulinas, lactoferrinas, lactoperoxidasa, albúmina sérica, lisozima y factores de crecimiento).

Mientras que el poder contaminante del suero de leche es bien conocido, este efluente de la industria láctea también representa una excelente fuente de proteínas funcionales y péptidos, vitaminas, minerales y lactosa (Tabla 1) que hasta hace relativamente poco

tiempo no habían sido reconocidas. Estos componentes del lactosuero, y principalmente sus proteínas y péptidos que poseen alto valor nutricional, han propulsado su transformación desde un material de desecho a un producto lácteo valioso con aplicación en la industria agroalimentaria, biotecnología y farmacéutica.

### **1.1 Valorización del suero**

Antiguamente considerado un residuo de la elaboración de algunos productos lácteos, principalmente quesos, el suero ha experimentado en las últimas décadas un profundo y acelerado proceso de revalorización.

Tradicionalmente, se consideraba al suero como un elemento no deseable, de escaso interés y de alto costo de eliminación. La práctica más común ha sido sencillamente verterlo en los cursos de agua, lo que es muy perjudicial desde el punto de vista ambiental. En efecto, se puede estimar que una fábrica de queso que procesa 280000 litros de leche cruda por día, por ejemplo, produce alrededor de 250000 litros de suero líquido y puede contaminar tanta agua como una ciudad de 50000 habitantes. Una práctica menos perjudicial de uso muy frecuente es su suministro a terneros o cerdos para complementar su alimentación.

Al desarrollarse la industria quesera, resultó evidente que estas soluciones no eran suficientes para afrontar el problema de la eliminación del suero. Asimismo restricciones legales a la contaminación ambiental por suero se fueron aplicando progresivamente en los países donde más abundante es su producción. Esto obligó a los fabricantes de quesos a procesar el suero o a disponer instalaciones propias de eliminación, lo que repercutió negativamente en los rendimientos productivos. La industria se esforzó entonces por desarrollar instalaciones para el secado y por encontrar nuevos usos para el suero. Paralelamente, estas medidas han contribuido también a intensificar la investigación sobre los usos alternativos del suero, agregándose innumerables alternativas de procesamiento de complejidad tecnológica creciente que permiten obtener múltiples ingredientes de usos alimentarios y no alimentarios, de altísimo valor agregado.

## 1.2 Procesos y productos

**Suero líquido.** Sin ningún tratamiento el suero puede agregarse al agua de animales de granja. Además de las proteínas de alta calidad y lactosa que contiene, el suero aporta calcio, fósforo y vitaminas solubles en agua. Sin embargo su alta proporción de lactosa y minerales limitan su uso directo en alimentación (González Siso, 1996). También se lo ha sido utilizado como fertilizante en agua de riego pero tiene el inconveniente de dejar depósitos salinos residuales. La principal limitación de uso del suero líquido es que es perecedero y su transporte es muy costoso.

**Suero en polvo.** En esta forma el suero conserva las propiedades del producto fresco por más tiempo y facilita su manipulación y transporte. Diferentes tipos de suero en polvo son preparados, incluyendo suero concentrado, en polvo ácido o dulce, desmineralizado, enriquecido con grasas, entre otros. El principal mercado de este producto es la alimentación animal. Pequeñas cantidades de suero en polvo combinado con melaza o harinas de soja son utilizadas también en alimentación humana (helados, tortas, salsas, derivados lácteos, polvos de hornear, entre otros) (González Siso, 1996).

**Concentrados y aislados de proteínas de suero.** Las proteínas del suero tienen un valor nutricional muy elevado debido a un adecuado balance de aminoácidos, varios de ellos esenciales -como la lisina y el triptofano- además de otros aminoácidos azufrados, que les otorgan un altísimo valor biológico. El creciente conocimiento sobre las propiedades físico-químicas y funcionales de las proteínas de suero y los avances en los procesos de fraccionamiento, han sido la base para el desarrollo de nuevas aplicaciones (Etzel, 2004). Mediante procesos de ultrafiltración las proteínas de suero son concentradas generándose productos con distintas proporciones de proteína 35 %, 50 %, 65 % y 80 % (p/p). Con procesamientos adicionales de diafiltración o cromatografía de intercambio iónico pueden producirse aislados de pureza igual o mayor al 90 %. Actualmente se producen de esta manera  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactalbumina a escala industrial (Smithers, 2008).

Las proteínas de suero tienen una amplia aplicación en alimentos y nutrición, utilizándose como sustituto parcial de la leche en polvo descremada o como fuente de proteína de alta calidad nutricional y funcional en comidas rápidas, jugos, confitería,

helados, galletitas, carnes procesadas, bebidas lácteas proteicas, postres, alimentos para niños y productos dietéticos. Asimismo se aplican como surfactantes en diferentes productos cosméticos tales como cremas para piel, sales de baño y detergentes (Audic y col., 2003) y en la elaboración de películas plásticas para recubrir alimentos, drogas y papeles especiales (McHugh y col., 1994; Han y Krochta, 1999). La hidrólisis enzimática de las proteínas de suero incrementa su solubilidad en agua y modifica sus propiedades funcionales (Prieto y col., 2010), estos hidrolizados son utilizados como suplementos en fórmulas para infantes, ancianos, atletas y fisicoculturistas (Sousa y col. 2004).

**Lactosa y sus derivados.** La mayor parte de la lactosa del suero o del permeado es recuperada por un proceso que involucra su cristalización (Yang y Silva, 1995; Gänzle y col., 2008). Los mayores usos de la lactosa incluyen su inclusión como ingrediente alimentario, en fórmulas para infantes, excipiente o recubrimiento para píldoras en la industria farmacéutica y como materia prima para la producción de derivados de la lactosa con valor agregado tales como lactulosa, lactitol, ácido lactobiónico, lactosil urea, galacto-oligosacaridos y lactosacarosa (Yang y Silva, 1995; Audic y col., 2003, Gänzle y col., 2008). Las soluciones de lactosa hidrolizada poseen mayor poder endulzante que la lactosa y tienen usos relacionados con los alimentos, particularmente en productos de confitería e industrias de helados reemplazando la sacarosa y jarabe de almidón (Guimarães y col., 2010).

**Suero como sustrato en la obtención de otros productos.** Otra aplicación del suero incluye su uso para la producción de compuestos de mayor valor por fermentación. Los ejemplos clásicos son la obtención de etanol y proteínas celulares mediante bioprocesos basados en la aplicación de levaduras, sin embargo se han propuesto múltiples productos alternativos (Yang y Silva, 1995; González Siso, 1996; Audic y col., 2003). Entre estos bioproductos se encuentran el biogás (metano), ácidos orgánicos (acético, propiónico, láctico, cítrico, glucónico, giberélico), aminoácidos (glutámico, lisina y treonina), vitaminas (B12 y B2, cobalaminas y riboflavina), polisacáridos (goma xántica, dextran, fosfomanano, pupulano, gelano), mono y oligosacáridos (galacto-oligosacáridos, lactulosa, lactosacarosa, tagatosa), enzimas ( $\beta$ -galactosidasa y poligalactorunasa) y otros compuestos (fructosa-difosfato, 2,3-butanodiol, calcio,

magnesio acetato, lactato de amonio, butanol y glicerol) (Guimarães y col., 2010; Illanes, 2011).

### 1.3 Propiedades funcionales de componentes del suero

Las propiedades funcionales de los distintos sueros, los concentrados y los aislados de proteínas son innumerables: capacidad emulsificante, gelificante, sustitución de grasa láctea en productos dietéticos, solubilidad, aireación, desarrollo de color y sabor, ligante de agua, viscosidad y solubilidad, entre otras (Fennema, 1996; Foegeding y col., 2002; Vega y Roos, 2006).

Por otro lado, se ha demostrado que el suero y algunos de sus componentes presentan propiedades benéficas para la salud. Proteínas de suero tales como la  $\beta$ -lactoalbúmina, la  $\alpha$ -lactoglobulina, la lactoferrina, la lactoperoxidasa y la albúmina de suero bovino poseen alto valor biológico, estimulan el sistema inmune y presentan actividad antimicrobiana, entre otras propiedades metabólicas (Madureira y col., 2007).

Aparte de la bio-actividad inherente a muchas de las proteínas del suero, la hidrólisis enzimática de las mismas genera péptidos bioactivos. Se ha demostrado que algunos de estos péptidos mejoran la respuesta inmunológica y presentan propiedades antimicrobianas, antihipertensivas, antiinflamatorias y antitumorales (Papenburg, 1990; Hakkak, 2001; Gauthier y col., 2006; Michaelidou y Steijns, 2006; Clement y col., 2007; Saito, 2008). Como ejemplos de péptidos bioactivos derivados de proteínas de suero pueden mencionarse: (i) la albutensina que inhibe a la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y estimula la contracción del íleon y la soroforina con actividad opioide, ambas derivadas de la albúmina sérica; (ii) la  $\alpha$ -lactoforina, que proviene de la  $\alpha$ -lactoalbúmina, inhibe la ECA; (iii) los péptidos  $\beta$ -lactoforina y  $\beta$ -lactotensina, derivados de la  $\beta$ -lactoglobulina, inhiben y estimulan la contracción del íleon respectivamente; (iv) la lactoferrina y otros estrechamente relacionados, derivados de la digestión peptídica de la lactoferrina, que poseen actividad antimicrobiana/antiviral, inmunomoduladora y antioxidante (Korhonen, 2006). Estos últimos son los péptidos bioactivos derivados de proteínas de suero más prometedores comercialmente (El-Loly y col., 2011).

El efecto positivo sobre la salud, sumado a su alto valor nutricional, hace que las proteínas de suero y sus derivados sean cada vez más utilizados como ingredientes versátiles en la elaboración de alimentos, tanto para mejorar su calidad como su funcionalidad. Entre los productos en los que se utilizan se pueden mencionar fórmulas para infantes, suplementos entéricos y clínicos, productos para nutrición deportiva, productos para control de peso y para el control del estado anímico (Süha Yalçın, 2006).

#### **1.4 Producción de suero en la Argentina**

Dado que el suero líquido proviene mayoritariamente de la elaboración de quesos, este producto presenta particular importancia en países como el nuestro, con una arraigada tradición quesera y niveles significativos de producción.

En Argentina el sector industrial lácteo puede dividirse en tres segmentos claramente identificados:

- Un grupo de unas 10-12 empresas con una recepción de más de 250000 litros diarios, diversificadas en sus líneas de producción, mayormente con actividad exportadora, y que procesan el 50-55 % de la producción nacional.
- Un grupo de unas 90-100 empresas con una recepción de entre 20.000 y 250000 litros diarios, que juegan un fuerte papel en el sector quesero y con una actividad exportadora inexistente, y que procesan el 25 % de la producción nacional.
- Más de 1000 empresas y tambos fábrica con menos de 20000 litros diarios de recepción, que se dedican casi en forma exclusiva a la fabricación de quesos, y que procesan el 20-25 % de la producción nacional.

De esta manera, comparado con otros países reconocidamente lecheros, Argentina se caracteriza por tener una gran cantidad de empresas lácteas que transforman cerca de la mitad de la producción nacional de leche en quesos. Y a su vez, cerca de la mitad de esta producción quesera es desempeñada por más de mil pequeños establecimientos (CIL, 2003).

Sólo las grandes empresas, que como se mencionó anteriormente procesan cerca del 50 % de la producción láctea, poseen tecnologías de punta para el procesamiento de suero. Las principales plantas procesadoras de suero son AFISA (Arla Food Ingredients SA, empresa conjunta al 50 % entre la empresa danesa Arla y la argentina Sancor), con una

planta en la localidad cordobesa de Porteña; y Remotti, con plantas en Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires. Otras son: Mastellone Hnos., Milkaut, García Hnos., Sobrero y Cagnolo, Cotapa, Arcolen, Williner, Saputo, Cooperativa de James Craik y Lácteos Conosur. Estas compañías líderes producen suero en polvo y concentrados proteicos (~ 5 %), así como lactosa y sus derivados (~ 33 %). Gran parte de estos productos son exportados a países de todo el mundo, siendo los principales importadores Brasil, Indonesia, China, Chile y Singapur (Schaller, 2009).

Las restantes, cerca de 1000 empresas lácteas argentinas productoras de queso, no cuentan con capacidad para procesar el suero producido. Parte del suero es utilizado para la producción de ricota. En la elaboración de este producto, las proteínas son precipitadas por calentamiento en medio ácido, de manera que se aprovechan solamente las propiedades nutricionales de mismas. El resto del suero, se estima que aproximadamente el 62 % del total de la producción en Argentina, es utilizado en alimentación animal o vertido como efluente a los ríos (Pescuma y col., 2010).

Esto valores dan idea de que en nuestro país el suero continúa siendo un importante problema ambiental. A su vez la sub-utilización o descarte del suero dejan fuera de los canales de consumo humano una fuente valiosa de proteínas de alta calidad y desaprovechan además el potencial económico de este producto. Es por tanto, necesaria la búsqueda de alternativas económicas de valorización del suero que sean aplicables a pequeñas y medianas empresas, conciliando de esta manera el interés del sector productivo con las demandas sociales de protección del medio ambiente.

## **2. Alimentos funcionales: Probióticos en aves**

### **2.1 Conceptos generales**

No existe una definición mundialmente acordada para el catalogar a los “alimentos funcionales”, aunque generalmente se considera funcional a aquellos alimentos que se consumen como parte de una dieta normal y contienen componentes biológicamente activos que ofrecen beneficios para la salud y reducen el riesgo de sufrir enfermedades. Este tipo de alimentos ha tenido un importante desarrollo en las últimas dos décadas, impulsado por el actual reconocimiento de que llevar un estilo de vida sano, incluida la dieta, puede contribuir a mantener el estado de salud y bienestar. Asimismo el

incremento de la esperanza de vida con los consecuentes costes sanitarios que implica, ha propiciado la búsqueda por parte de los gobiernos, los investigadores y los profesionales de la salud y de la industria alimenticia de complementos para mantener una vida saludable.

Como respuesta al creciente interés sobre este tipo de alimentos, han aparecido también organismos regulatorios que buscan establecer normas y directrices que regulen el desarrollo y la publicidad de dichos alimentos.

La Unión Europea ha creado una Comisión Europea de Acción Concertada sobre Bromatología Funcional en Europa (FUFOSE: Functional Food Science in Europe) coordinada por el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI: International Life Sciences Institute) cuyo objetivo es desarrollar y establecer un enfoque científico sobre las pruebas que se necesitan para respaldar el desarrollo de alimentos funcionales. Los integrantes de esta comisión en el artículo "Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus document" publicado por en la revista British Journal of Nutrition declaran que:

*"Los alimentos funcionales deberían presentarse en forma de alimentos normales, y que se deben demostrar sus efectos en las cantidades que normalmente se consumirían en la dieta. Un alimento funcional puede ser un alimento natural, un alimento al que se ha añadido un componente, o un alimento al que se le ha quitado un componente mediante medios tecnológicos o biológicos. También puede tratarse de un alimento en el que se ha modificado la naturaleza de uno o más de sus componentes, o en el que se ha modificado la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes, o cualquier combinación de estas posibilidades. Un alimento funcional puede estar destinado a toda la población o a grupos determinados, que se pueden definir, por ejemplo, según su edad o su constitución genética".*

Asimismo la FUFOSE apoya el desarrollo de dos tipos de alegatos de salud, que se indican a continuación, con respecto a los alimentos funcionales:

1. TIPO A: Alegatos de "mejora de función" asociados a determinadas funciones fisiológicas y psicológicas y/o actividades biológicas que son modificadas por la ingesta del alimento.
2. TIPO B: Alegatos de "reducción de riesgo de enfermedades" , que se asocian al consumo de un alimento o de sus componentes para ayudar a reducir el riesgo de



padecer una determinada enfermedad o afección, gracias a los nutrientes específicos que contenga o no contenga dicho alimento.

Entre los productos funcionales los lácteos son los más estudiados y numerosos. Estos están producidos frecuentemente por la fermentación de leche u otros productos lácteos por bacterias probióticas o por su enriquecimiento con los metabolitos que estas producen (Saxelin y col., 2003). Los productos lácteos funcionales pueden clasificarse en tres grupos:

1) Probióticos: son microorganismos vivos que al ser administrados en dosis adecuadas confieren efectos benéficos para la salud del hospedador (FAO/WHO 2002). Además, se llama alimento probiótico a aquél que contenga como ingrediente a estos microorganismos vivos, en una dosis suficiente y en una matriz alimentaria adecuada de modo que, luego de su ingestión, se obtenga el efecto deseado, independientemente de sus propiedades nutricionales (Schrezenmeir y De Vrese, 2001).

2) Prebióticos: son componentes alimentarios no digeribles que ejercen efectos benéficos en el hospedador al estimular selectivamente el crecimiento o modificar la actividad metabólica de una especie bacteriana colónica, o de una cantidad limitada de esas especies (Gibson y Robertfroid, 1995). El fundamento de la acción de los prebióticos es que no pueden ser digeridos en el tracto gastrointestinal proximal, debido a la inexistencia de enzimas digestivas capaces de hidrolizar las uniones glucídicas que presentan. Actúan como fibras solubles y son fermentados a nivel del colon, favoreciendo la actividad y estimulando del crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos. Los prebióticos más estudiados son la inulina, los fructooligosacáridos (FOS), los galactooligosacáridos (GOS) y los glucooligosacáridos tales como los  $\beta$ -glucanos.

3) Simbióticos: resultan de una combinación de probióticos y prebióticos, que afectan benéficamente la salud del hospedador favoreciendo la supervivencia e implantación de microorganismos selectivos vivos en el tracto gastrointestinal (Schrezenmeir y De Vrese, 2001).

En las últimas décadas, con el creciente interés en los cuidados de la salud y la disminución de riesgos, la atención de los consumidores, así como de la industria y la investigación, los probióticos adquirieron gran significancia. Se encuentran en el

mercado diversas marcas comerciales de productos de probada o potencial actividad probiótica, así como también, existen productos fermentados naturales que se elaboran en forma artesanal y pueden considerarse probióticos (kefir, yogur).

## 2.2. Microbiota intestinal y su rol en la salud

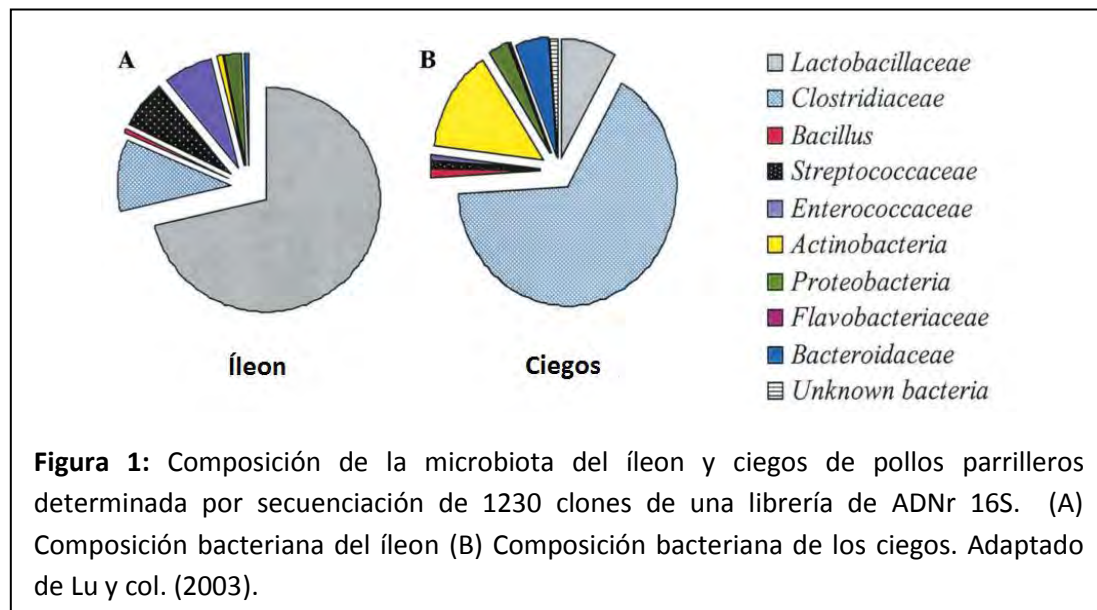
El intestino delgado del pollo recién nacido es inmaduro y su desarrollo requiere cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares que ocurren durante las 2 primeras semanas de vida, aunque los cambios más dramáticos suceden dentro de las 24 h después del nacimiento. Durante las primeras 48 h luego de la eclosión, la yema contribuye al mantenimiento del intestino delgado y a su desarrollo. Durante este período, el pollo debe hacer la transición entre utilizar energía en forma de lípidos provistos por la yema al empleo de alimento exógeno rico en carbohidratos (Noy y Sklan, 1999). El consumo de alimento es acompañado por el rápido desarrollo del tracto gastrointestinal y los órganos asociados, siendo determinante para el desarrollo del intestino y su función (Potturi y col., 2005).

El estadio temprano luego de la eclosión es también crítico para el establecimiento de la comunidad microbiana del tracto intestinal. Este proceso inicia con un ambiente gastrointestinal estéril al momento de la eclosión y continúa hacia el establecimiento de una comunidad microbiana que se hace más compleja a medida que el animal crece (Van Der Wielen y col., 2002) desarrollando cada región un perfil microbiano distintivo (Gong y col., 2008).

El tracto gastrointestinal de los pollos contiene bacterias, hongos y protozoos, pero las bacterias son los microorganismos predominantes (Gabriel y col., 2006). La concentración de microorganismos aumenta de la región proximal a la distal, siendo en el íleon de  $10^{8-9}$  UFC/g y en los ciegos de  $10^{10-11}$  UFC/g (Chambers y Gong, 2011). Se estima que el tracto gastrointestinal de los pollos posee cerca de  $10^{13}$  bacterias y que 90% de las mismas aún no han podido ser cultivadas e identificadas por métodos de cultivo convencionales (Apajalahti y col., 2004; Chambers y Gong, 2011). A partir del desarrollo de métodos moleculares para el estudio de comunidades microbianas complejas, se han publicado numerosos trabajos con la finalidad de caracterizar la microbiota del íleon y ciego de pollos y el rol de la alimentación en estas comunidades

(Guan y col., 2003; Lu y col., 2003; Bjerrum y col. 2006; Gong y col., 2008; Nava y col., 2009)

Lu y col., (2003) mediante clonado y secuenciación de genes de ARNr 16S describieron que la microbiota del íleon se halla dominada por especies del género *Lactobacillus*, siguiéndoles en abundancia bacterias pertenecientes a las familias *Clostridiaceae*, *Streptococcaceae* y *Enterococcaceae*, mientras que en los ciegos el grupo predominante es *Clostridiaceae* (Figura 1).



Las bacterias comensales normales de intestino coexisten en equilibrio dinámico con el hospedador y su metabolismo representa gran parte de la actividad bioquímica del organismo, influenciando el estado nutricional y la salud del hospedador.

Algunos microorganismos pueden afectar negativamente al hospedador al desencadenar respuestas inflamatorias, generar infecciones localizadas o sistémicas o sintetizar toxinas o compuestos perjudiciales. Otros, principalmente *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, en cambio contribuyen de forma significativa al estado de salud del hospedador, por sus funciones: a) metabólicas, interviniendo en la asimilación de nutrientes de la dieta y glicanos endógenos; b) protectoras, contribuyendo al efecto barrera y al desplazamiento de microorganismos patógenos y c) tróficas, interviniendo en la modulación del sistema inmune, en el desarrollo y la proliferación celular (Tannock, 2004; Lan y col., 2005).

Consecuentemente la manipulación de la microbiota intestinal se ha convertido en una estrategia para prevenir la colonización de enteropatógenos, así como para promover la salud y rendimiento productivo de los pollos (Chambers y Gong, 2011).

### **2.3 Productos probióticos y su aplicación**

La prevención y control de enfermedades ha llevado durante las últimas décadas a incrementos sustanciales en el uso de antibióticos como curativos, profilácticos y factores de crecimiento. Sin embargo, la utilidad de los agentes antimicrobianos como medida preventiva ha sido cuestionada debido a la diseminación de resistencia a antimicrobianos entre bacterias patógenas, lo que puede tener serias consecuencias en el tratamiento de personas contra estos patógenos (Foley y Lynne, 2008; Gyles, 2008; Mathers y col., 2011; Rodicio y col., 2011). Las crecientes restricciones respecto al uso de antimicrobianos sumadas a la preocupación de los consumidores por los efectos nocivos de la presencia de residuos de antibióticos en los alimentos, incluidas las reacciones alérgicas y los efectos carcinogénicos, han propiciado la búsqueda, por parte de los productores, de alternativas para el control de patógenos (Kabir, 2009).

Algunas de soluciones potenciales que han emergido en las últimas décadas como alternativas al uso de antibióticos como promotores del crecimiento en producción animal son: i) los probióticos, ii) compuestos químicos no tradicionales, iii) bacteriófagos, iv) ácidos orgánicos, extractos de plantas y aceites esenciales (Tellez y col., 2011).

Los probióticos son una opción cada vez más aceptada por los productores. El concepto de probióticos en aves surgió a partir de la idea de administrar microorganismos del tracto intestinal de individuos adultos a pollos recién nacidos. Esto se fundamenta en que las aves comerciales nacen en incubadoras, siendo privadas del contacto con microorganismos intestinales provenientes de la madre. El tracto gastrointestinal de pollos recién nacidos es inmaduro y sufre modificaciones morfológicas, bioquímicas y moleculares durante 2 semanas luego del nacimiento. La adquisición de la microbiota intestinal en esta etapa es crítica para el desarrollo del tracto intestinal y de los órganos asociados y depende en gran medida de la alimentación (Yegani y Corver, 2008).

En 1973, Nurmi y Rantala demostraron por primera vez que el tratamiento de pollos recién nacidos con una suspensión de material proveniente del intestino de pollos

adultos aumentaba la resistencia de los mismos a contraer *Salmonella* sp. Este efecto protector se denominó popularmente “exclusión competitiva (EC)” o “concepto de Nurmi” y actualmente existen numerosas preparaciones comerciales basadas en este principio en el mercado.

Las preparaciones comerciales de EC frecuentemente contienen cultivos microbianos realizados a partir del tracto intestinal de individuos adultos sanos de la misma especie. Algunos de los productos probióticos para aves más populares existentes en el mercado son AviFree, Aviguard, Broilact, MSC, Preempt y CF-3 (Schneitz, 2005). Todos ellos son cultivos mixtos derivados del contenido cecal de aves domésticas, que presentan una composición de especies desconocida. Los mismos tienen un largo historial de uso y predominan en el mercado no europeo (Applegate y col., 2010). Sin embargo el uso de cultivos no definidos está restringido legalmente en algunos países, por ejemplo en la Unión Europea (EFSA, 2005b, 2007, 2008). Una de los riesgos de este tipo de productos es la transferencia de patógenos oportunistas a individuos susceptibles que los consumen (Mead, 2000). Otro riesgo es la transferencia de genes de resistencia a antibióticos a la microbiota del tracto intestinal de las aves o del humano que las consume (Tollefson y col., 1997).

Otros probióticos comerciales contienen una o más cepas bacterianas de identidad conocida. Existe un cultivo constituido por *Lactobacillus reuteri* que se utiliza comercialmente aunque su eficacia contra enteropatógenos ha sido cuestionada (Schneitz, 2005). Se ha descrito que los probióticos multiespecíficos son más efectivos que aquellos compuestos por una o unas pocas especies (Timmerman y col., 2004).

Se han llevado a cabo, además, numerosos estudios sobre el uso de cepas potencialmente probióticas en aves que aún no se comercializan. Los microorganismos más comúnmente estudiados como probióticos incluyen bacterias ácido lácticas, bifidobacterias, *Bacillus* spp., *Bacteroides* spp., *Escherichia coli*, *Propionibacterium* spp., *Streptococcus* spp. y levaduras (Applegate y col., 2010). Se espera que los probióticos aumenten la resistencia de las aves a la colonización por patógenos sin producir efectos adversos sobre su salud. Numerosos probióticos han demostrado reducir la colonización intestinal de *Salmonella* (Al-Zenki y col., 2009; Mountzouris y col., 2009; Vilà y col., 2009; Higgins y col., 2010; Knap y col., 2011; Menconi y col., 2011), de *Clostridium perfringens*

(Hofacre y col., 1998; Knap y col., 2010) y de *Campylobacter* spp. (Soerjadi y col., 1982; Soerjadi-Liem y col., 1984; Schoeni y Wong, 1994; Santini y col., 2010).

Algunos autores han reportado además que los probióticos mejoran la productividad de las aves, sin embargo los datos de la literatura disponibles ofrecen una variedad de resultados conflictivos en lo referente a la eficacia de los probióticos en la mejora de rendimiento de los pollos. Algunos estudios indican que ocasionan una mejora en la productividad. Awad y col. (2009) hallaron que la administración de un probiótico constituido por *Lactobacillus* sp. homofermentativos y heterofermentativos adicionados al alimento ( $10^8$  UFC/tonelada) producía mejoras en la ganancia de peso diaria, conversión alimentaria, rendimiento del cadáver, peso de los órganos y morfología del epitelio intestinal de pollos de 1 a 35 días de edad. Kim y col. (2011) también reportaron que la inclusión en la dieta de un probiótico multi-específico aumentaba el rendimiento productivo de las aves. Paralelamente demostraron que había una disminución de la concentración de coliformes y *Clostridium* sp. en los ciegos, un cambio en la morfología del intestino delgado y un aumento de la digestibilidad de nutrientes. Alkhalif y col. (2010) hallaron que la administración del probiótico comercial Bactocell® compuesto por *Pediococcus acidilactici* ( $0.8-1 \times 10^9$  UFC/kg de alimento) adicionado a la dieta mejora la ganancia de peso diaria y la conversión alimentaria de pollos entre 3-6 semanas. Asimismo reportaron una disminución en el colesterol en sangre por el tratamiento con el probiótico. Efectos promotores del crecimiento han sido informados por otros autores (Timmerman y col., 2006; Radfar y col. 2008; Wu y col., 2008; Alkhalif y col., 2010; Bahrain Pour y Kermanshahi, 2010). Igual de frecuentes son los estudios que no hallan efecto de los probióticos en la productividad de pollos de engorde. Telg y Caldwell (2009) no hallaron diferencias significativas en la conversión alimentaria ni en la ganancia de peso por administración de un probiótico comercial de composición definida y Czerwiński y col. (2010) tampoco hallaron diferencias en el rendimiento de pollos Ross por administración en el alimento del probiótico LABYuc-Probio compuesto por bacterias ácido lácticas, *Saccharomyces cerevisiae* y extracto de *Yucca schidigeri*. Rahimi y col. (2011) demostraron que la administración del probiótico comercial Primalac® no tenía efecto sobre la conversión alimentaria ni el peso de los órganos. Otros autores han informado resultados similares negando el efecto promotor del

crecimiento de diversos probióticos (Chumpawadee y col., 2009; Vilà y col. 2009; Houshmand y col., 2011).

#### **2.4 Mecanismos de acción de los probióticos**

Los probióticos pueden intervenir en la función metabólica y fisiológica del intestino de pollos actuando a través de diferentes mecanismos tales como los que se listan a continuación:

**Prevención de la colonización de patógenos.** Se ha descrito que los probióticos mejoran el estado de salud y reducen el riesgo de contraer enfermedades entéricas y sistémicas de aves. Los mecanismos por los cuales ejercen este efecto son aún poco claros. El mecanismo más frecuentemente descrito es la “exclusión competitiva”. Esto se refiere al bloqueo físico de la colonización de patógenos oportunistas por la adhesión de bacterias probióticas. Los probióticos también pueden prevenir la colonización intestinal de patógenos mediante otros mecanismos. Por ejemplo *Lactobacillus plantarum* inhibe la adhesión de *E. coli* enterohemorrágica induciendo la transcripción y secreción de mucinas MUC 2 y MUC3 por células globulares (Fooks y Gibson, 2002). *Lactobacillus kefir* es capaz de inhibir la adhesión e invasión de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis a células Caco-2/TC7 mediante la secreción de proteína de capa-S que interactúa con estructuras de la superficie del patógeno (Golowczyc y col., 2007).

Los probióticos pueden además competir con los patógenos por los nutrientes (Cummings y Macfarlane, 1997) o producir cambios en el microambiente del tracto intestinal que afectan la supervivencia, adhesión o invasión de los patógenos. Los ácidos grasos producidos por los probióticos, como parte de su metabolismo nutricional, disminuyen el pH del medioambiente intestinal afectando la supervivencia de bacterias patógenas (Marteau y col., 2004).

Estos cambios en el ambiente físico pueden afectar además la función del epitelio intestinal y del metabolismo en general. Los ácidos grasos volátiles sirven como fuente de energía a los colonocitos y afectan el transporte de nutrientes, el metabolismo, el crecimiento y la diferenciación de estas células (Marteau y col., 2004). Estos compuestos además son rápidamente absorbidos en el epitelio del intestino delgado y colon, estimulando la absorción de electrolitos y agua y afectando el crecimiento de las células

epiteliales. Los ácidos orgánicos pueden también actuar como fuente de energía para las aves. Se ha descrito que están implicados en la regulación hepática de lípidos y carbohidratos, y que actúan como sustrato energético en músculos, riñón y cerebro (Chichlowski y col., 2007a).

Los probióticos pueden, además, producir bacteriocinas o sustancias inhibitorias no proteicas. Por ejemplo la popiridina, una poliamina modificada, producida por la microbiota intestinal inhibe la adhesión e internalización de *Salmonella* y *Shigella* a células epiteliales intestinales (Gusils, 2003).

**Mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal.** Los enterocitos actúan como barrera protectora contra microorganismos y sustancias que no sirven de nutrientes. Un componente importante para la función de barrera del epitelio intestinal es el mucus secretado por células globulares que se hallan dispersas en el epitelio. El mismo consiste en mucinas, proteínas, glicoproteínas, lípidos, glicolípidos y receptores solubles que reconocen proteínas específicas que facilitan la adhesión bacteriana. Los probióticos pueden contribuir a mejorar la función de barrera del epitelio intestinal afectando la secreción de mucus. Caballero-Franco (2007) observó que luego del tratamiento con probióticos el contenido de mucina luminal aumentaba un 60 % respecto al valor basal, sugiriendo una estimulación de la expresión de MUC2 o un aumento del número de células globulares. Chichlowski (2007b) describió un mayor número de células globulares en el epitelio intestinal de pollos luego del tratamiento con probióticos. Adicionalmente ensayos *in vitro* han demostrado un incremento en la producción de mucinas, especialmente MUC3, luego del tratamiento con numerosas especies de *Lactobacillus* (Montalto y col., 2004). Se cree que metabolitos producidos por la fermentación bacteriana juegan algún rol en el crecimiento y maduración de células globulares.

**Morfología intestinal y absorción de nutrientes.** Se ha reportado que la administración de probióticos modifica la histomorfología del epitelio intestinal de las aves. Awad y col. (2009) asociaron la mayor productividad de pollos, debida al consumo de probiótico, con un aumento de la altura de las vellosidades en relación a la profundidad de las criptas en el duodeno e íleon. También se ha demostrado el aumento de la altura de las vellosidades del íleon por adición de *Enterococcus faecium* (Samli y col., 2007), *Bacillus subtilis* var. *natto* (Samanya y Yamauchi, 2002) y de un probiótico multiespecie (Kim y



col., 2011) a la dieta de pollos. De similar manera, Chichlowski y col. (2007b) reportaron un aumento de la longitud de las vellosidades del yeyuno por el consumo de un probiótico constituido por *Bifidobacterium thermophilum* y *E. faecium*. El aumento de la altura de las vellosidades es un indicador de la activación de la función intestinal (Yasar y Forbes, 1999; Shamoto y Yamauchi, 2000). La mayor altura de las vellosidades conduce al incremento en la función absorbente del intestino debido al aumento de la superficie de absorción, de la expresión de enzimas del borde en cepillo y de los sistemas de transporte de nutrientes (Awad y col. 2009). Esto sugiere que los probióticos activan la actividad del intestino. En este sentido se ha reportado un aumento de la absorción pasiva de prolina y glucosa en pollos por el consumo de *B. thermophilum* y *E. faecium* (Chichlowski y col., 2007b).

**Digestión y biodisponibilidad de nutrientes.** Los probióticos pueden generar compuestos asimilables a partir de compuestos complejos no digeribles por el hospedador, sintetizar nutrientes o aportar enzimas que aumenten su disponibilidad o reducir compuestos perjudiciales o antinutrientes. Los lactobacilos pueden secretar enzimas que contribuyen a la actividad amilasa intestinal. Jin y col. (2000) demostraron que la administración de *L. acidophilus* o una cultivo mixto de *Lactobacillus* a pollos durante 40 días aumenta significativamente ( $P < 0.05$ ) los niveles de amilasa. Esto también ha sido observado luego de la administración de probióticos a lechones (Collington y col., 1990). Asimismo está bien establecido que los probióticos pueden alterar la actividad de enzimas intestinales o la digestibilidad de nutrientes al modificar el pH gastrointestinal (Dierick, 1989). Se ha demostrado que *Aspergillus oryzae* afecta el metabolismo de macronutrientes en gallinas ponedoras, postulándose que interfiere en la digestibilidad de los mismos mediante la producción de enzimas amilolíticas y proteolíticas (Schneitz, 2005). También se ha reportado que el consumo de *Lactobacillus casei* por pollos causa una disminución de la actividad ureasa del intestino delgado acompañada por una mejora de la productividad (Yeo y Kim, 1997). Esta enzima está asociada con la conversión de ácido úrico, producto de excreción de nitrógeno en aves, en amoníaco que es un compuesto tóxico para los enterocitos. Lan y col. (2002, 2012) reportaron que la adición de una especie bacteriana productora de fitasa, *Mitsuokella jalaludinii*, a alimento pobre en fósforo mejora la ganancia de peso y disminuye la

conversión alimenticia [relación entre el alimento que consume y el peso que gana] de pollos. El fitato representa la mayor fuente de fósforo del alimento de los pollos pero los mismos no cuentan con las enzimas necesarias para su degradación. Este compuesto es además un anti-nutriente, ya que por su alta carga negativa retiene minerales reduciendo su disponibilidad, forma complejos con proteínas disminuyendo su digestibilidad e inhibe la actividad de la tripsina y la pepsina. De manera que las mejoras halladas en la productividad de las aves se asociaron con la capacidad de la bacteria probiótica de atacar enzimáticamente este antinutriente evitando sus efectos perjudiciales.

**Balance de la comunidad microbiana.** Numerosos estudios indican que la administración de *Lactobacillus* y *Bacillus* probióticos disminuyen los niveles de bacterias entéricas nocivas e incrementan los de bacterias benéficas productoras de ácido láctico de la microbiota intestinal. Mountzouris y col. (2007) reportaron que la administración de *Lactobacillus* en concentración  $2 \times 10^6$  UFC/g de alimento durante 42 días incrementaba la concentración de *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. y cocos gram positivos en los ciegos; mientras que no afecta la concentración de aerobios ni anaerobios totales, coliformes o *Bacteroides* spp. Li y col. (2009) hallaron un incremento de la concentración de *Lactobacillus* spp. y una disminución de la de *Bifidobacterium* sp. en el contenido cecal por la administración en la dieta de un probiótico constituido por *Lactobacillus* spp. y *Bacillus cereus*. Ha sido demostrado que la administración de *Bacillus subtilis* en la dieta en concentración  $10^3$  UFC/g de alimento reduce la concentración de *Clostridium* spp. y de *E. coli* en el contenido intestinal (Teo y Tan, 2007). También se ha descrito que la administración de *Enterococcus faecium* incrementa la concentración de bacterias ácido lácticas en el íleon de pollos (Samli y col., 2007). Cambios en la composición de la microbiota intestinal han sido ligados directamente con mejoras en el rendimiento de aves (Torok y col., 2008).

**Mejora la función del sistema inmune.** La manipulación de la microbiota intestinal a través de la administración de probióticos influencia el sistema inmune de diversas maneras. Se ha informado que regula positivamente la inmunidad celular y que aumenta la producción de anticuerpos, la interacción entre células T y células dendríticas y la señal de receptores Toll-like. Muchos de estos efectos han sido observados en el

intestino de pollos desafiados experimentalmente con patógenos entéricos (Lee y col., 2010).

Se ha demostrado que pollos tratados con probióticos producen mayor cantidad de anticuerpos frente a un determinado antígeno cumpliendo un importante rol como adyuvantes. A modo de ejemplo, los títulos de anticuerpos luego de la vacunación contra el virus de la enfermedad de Newcastle y contra *Eimeria* son mayores para pollos que consumen probiótico que para aquellos que no reciben el tratamiento (Lee y col., 2010).

La expresión de citoquinas en pollos es alterada en respuesta a una dieta que contiene probióticos. Distintos estudios han proporcionado pruebas de que los lactobacilos inducen la expresión de citocinas Th2, como IL-4 e IL-10 (Christensen y col., 2002; Lammers y col., 2003; Rakoff-Nahoum y col., 2004) y TGF- $\beta$ 1 (Lebman y col., 1999). A través de la estimulación de la producción de citoquinas por diferentes subconjuntos de células del sistema inmune, los probióticos intervienen en la inducción y regulación de la respuesta inmune (Maassen y col., 2000; Christensen y col., 2002; Lammers y col., 2003). A nivel celular se ha hallado que pollos que consumen *Lactobacillus* sp. tienen mayores porcentajes de linfocitos intraepiteliales intestinales CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y TCR2<sup>+</sup> comparados con pollos que no reciben probiótico (Dalloul y col., 2003). Por otro lado se ha reportado que la administración de probióticos a pollos ocasiona un incremento espontáneo de la proliferación de linfocitos en el bazo, lo que indicaría un aumento en la inmunidad celular (Dalloul y col., 2003; Lee y col., 2007). Farnell y col. (2006) reportaron además que los probióticos incrementan la degranulación y explosión oxidativa de heterófilos. Los heterófilos son la segunda mayor población de células sanguíneas de aves y cumplen una función equivalente a los neutrófilos de mamíferos siendo componentes críticos de la inmunidad innata a través de su función fagocítica y citolítica mediada por intermediarios reactivos de oxígeno, enzimas proteolíticas y otras sustancias microbicidas (Dar y col., 2009).

## **2.5. Consideraciones para la administración de los probióticos**

Varios factores afectan la efectividad del tratamiento por probióticos siendo la dosis y la forma de administración dos factores particularmente importantes a considerar.

Asimismo se ha sugerido que los probióticos pueden tener distinto efecto de acuerdo a la edad de los animales. Dado que durante la edad temprana la microbiota intestinal no está desarrollada y los pollos son más propensos a contraer enfermedades se ha propuesto la administración de probióticos inmediatamente luego del nacimiento (Vilagravel y col., 2010).

**Forma de administración.** Las vías de administración de probióticos más empleadas en aves son la inclusión en el agua de bebida o la pulverización, menos frecuentemente los productos son agregados directamente a los comederos o mezclados con el alimento, finalmente la aplicación en dosis individuales se limita a criaderos con bajo número de individuos (Schneitz, 2005).

La adición de los probióticos en el agua de bebida fue la primera forma de administración testada a campo, dando resultados exitosos (Wierup y col., 1988, 1992; Schneitz, 2005). Sin embargo, se han citado como desventajas de esta forma de administración el consumo desigual por individuo, la pérdida de viabilidad de algunos microorganismos anaeróbicos o sensibles al cloro del agua y la imposibilidad de administrar el producto a pollos recién nacidos (Schneitz, 2005).

El uso de aerosoles, como un método para administrar probióticos fue sugerido inicialmente por Pivnick y Nurmi (1982). Posteriormente, Goren y col. (1984, 1988) desarrollaron un modo de aplicación por aspersion para el tratamiento de los pollitos recién nacidos en criaderos. La aplicación por aspersion, ya sea manual (Schneitz y col., 1990) o automática (Chen y col., 1998; Schneitz, 1992) permite tratar a los polluelos con rapidez después de la eclosion y asegura un reparto equilibrado de los materiales de tratamiento. Además se ha demostrado que no causa efectos adversos sobre la salud o el rendimiento de las aves (Corrier y col., 1995). La pulverización en la cámara de cría seguida por la administración de agua potable fue utilizada por Blankenship y col. (1993) demostrando ser eficaz en el control de la infección por *Salmonella*, sin embargo no hay evidencia de que un doble tratamiento de este tipo ofrezca la máxima protección.

La posibilidad de que los pollos se infecten en las incubadoras ha alentado a los investigadores a buscar una forma de administración en la cual las aves puedan ser tratadas antes de la eclosion (Cox y col., 1990; 1991). Cox y col. (1993) desarrollaron un método *in ovo* en el que se introduce el producto probiótico en la cámara de aire o en el

amnios del huevo un par de días antes de la eclosión. Sin embargo, la aplicación en la cámara de aire reduce el porcentaje de nacimientos y la inoculación en el amnios mata a todos los embriones. Meijerhof y Hulet (1997) obtuvieron resultados similares con el producto comercial Broilact.

**Dosis.** La dosis de los probióticos es un factor importante en su uso efectivo. La dosis recomendada para la mayoría de los probióticos se halla en el rango de  $10^8$  a  $10^9$  UFC/pollo por día (Mountzouris y col., 2010). Hay acuerdo general en que la eficacia es dependiente de la dosis, sin embargo algunos autores han descrito mayor efectividad a dosis elevadas mientras que otros han hallado el efecto inverso. Higgins y col. (2008) demostraron que la aplicación de un probiótico constituido por once BAL (FM-B11; Ivesco, LLC, Springdale, AR) en concentración  $10^6$  y  $10^8$  UFC/pollo después del desafío con  $10^4$  UFC/pollo de *Salmonella* Enteritidis reduce el riesgo de colonización intestinal del patógeno, mientras que empleando una dosis de probiótico  $10^4$  UFC/pollo no detectaron protección. Kim y col. (2011) reportaron que la administración de un probiótico multiespecie en dosis  $10^8$  y  $10^9$  UFC/kg de alimento era más efectiva en la mejora de parámetros productivos de pollos que una dosis de  $10^7$  UFC/kg. En el mismo sentido, se ha indicado que *Bacillus subtilis* mejora en mayor medida el rendimiento de las aves administrado en dosis  $10^6$  UFC/kg de alimento que en dosis  $10^4$  UFC/kg (Teo y Tan, 2007). Sin embargo, Mountzouris y col. (2010) hallaron un mejor rendimiento en pollos por el consumo del probiótico PoultryStar® en concentración  $10^8$  UFC/kg que cuando se utilizó en concentración  $10^9$  y  $10^{10}$  UFC/kg. Asimismo, el efecto de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en el aumento de peso de las aves fue mayor cuando la dosis de probiótico se disminuyó de  $8 \times 10^9$  a  $2-6 \times 10^9$  UFC/kg (Apata, 2008). Esta diversidad de resultados indica que la dosis es dependiente del producto y que un nivel mayor de administración no siempre conduce a un efecto mayor. Por otra parte la eficiencia de los probióticos, a una determinada dosis, está condicionada por diversos factores que dificultan aún más la generalización, tales como su composición de especies microbianas, la viabilidad en el alimento y en el tracto intestinal, el método y frecuencia de aplicación, la dieta basal, la edad de las aves, la higiene del ambiente y otros factores ambientales causantes de estrés (Mountzouris y col., 2010).

## 2.6 Marco legal

Debido a la tendencia mundial en la aplicación de restricciones legales en el uso de antibióticos como promotores de crecimiento en la industria avícola, se prevé un aumento de la incidencia de enfermedades en aves y en el hombre. A raíz de este temor se ha impulsado la búsqueda de alternativas de control a través de promoción de subsidios para investigación en estas áreas. Son ejemplos de esta situación, los proyectos europeos C-EX (Development of a Competitive Exclusion Product for Poultry Meeting the Regulatory Requirements for Registration in European Union), PoultryFlorGut, REPLACE y PROEUHEALTH-PROPATH (Anadón y col., 2006). Como consecuencia la investigación en el desarrollo de productos probióticos para animales ha sufrido grandes avances. Sin embargo la implementación de estos avances en el mercado se ha visto obstaculizada por el proceso de regulación y registro de productos comerciales. Las restricciones y la velocidad de aprobación de estos productos varían entre países. En Estados Unidos y Europa se ha realizado un significativo progreso en la legislación para la evaluación segura de probióticos (EFSA, 2005a; FAO/WHO, 2002) sin embargo, no hay aún un único estándar disponible y muchos países aún no cuentan con normativas que contemplen estos productos.

En la Unión Europea los aditivos para alimentos animales se hallan regulados por el Reglamento (CE) nº 1831/2003 y sus normas en desarrollo (Reglamento (CE) Nº 429/2008). En este reglamento se contemplan aditivos que puedan influir positivamente en el rendimiento de los animales en buen estado la salud o aquellos utilizados para influir positivamente el medio ambiente. La categoría "aditivos zootécnicos" se encuentra dividida en cuatro grupos funcionales:

- (a) digestivos: sustancias que, suministradas a los animales, facilitan la digestión de la dieta, actuando sobre determinadas materias primas para piensos;
- (b) estabilizadores de la flora intestinal: microorganismos u otras sustancias definidas químicamente que, suministradas a los animales, tienen un efecto positivo en la flora intestinal;
- (c) sustancias que influyen positivamente en el medio ambiente;
- (d) otros aditivos zootécnicos.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria publicó una guía que orienta a los interesados en la preparación y presentación de sus solicitudes de autorización de estos

productos. La guía se halla dividida en 6 secciones: (1) resumen del expediente, (2) identificación y caracterización de las condiciones de uso del aditivo y métodos de control, (3) estudios referidos a la seguridad del aditivo, (4) estudios referidos a la eficacia del aditivo y (5) plan de monitoreo post-venta. El documento debe estar abalado por datos científicos pertinentes (publicados y no publicados, tanto favorables como desfavorables) que constituyen la base de fundamentación. El producto debe estar caracterizado en cuanto a sus propiedades físicas, químicas y biológicas, estabilidad, compatibilidad con otros ingredientes alimentarios, condiciones de uso, métodos de control. Asimismo debe indicarse el nombre científico de los microorganismos y su procedencia. Deben presentarse pruebas que demuestren que es seguro para el animal, el consumidor y el medioambiente debiendo efectuarse ensayos de toxicidad oral, genotoxicidad, mutagenicidad, producción de toxinas y factores de virulencia, resistencia a antibióticos y transmisibilidad de los mismos, asimismo debe contemplarse el margen de seguridad evaluándose el riesgo de un aumento accidental de la dosis. La eficacia debe evaluarse en al menos 3 ensayos demostrando efectos significativos ( $P < 0.05$ ) en el animal específico para el cual estará destinado (EFSA, 2008).

Las exigencias de los ensayos requeridos por estas normas igualan a los necesarios para la aprobación de sustancias químicas frecuentemente dificultando la aplicación de estos estudios a microorganismos (Anadón y col., 2006). Estas estrictas regulaciones han conducido a que existan en el mercado europeo unos pocos aditivos probióticos para aves conteniendo una o excepcionalmente dos especies. Mientras que en países no europeos ni norteamericanos el mercado se halla dominado por productos probióticos de composición indefinida o parcialmente definida cuya efectividad ha demostrado ser notoriamente superior (Dunne y col., 1999; Sanders y col., 1999; Klose y col., 2006).

Recientemente en Europa, la European Food Safety Authority (EFSA) ha introducido el concepto de Qualified Presumption of Safety (QPS) similar al concepto de GRAS (Generally Regarded As Safe) regulado por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos. El concepto de QPS provee un sistema de evaluación de seguridad aplicable a todos microorganismos deliberadamente introducidos en la cadena alimentaria (EFSA, 2005b). Esto significa un gran avance al permitir que las especies contempladas bajo este status puedan entrar en el mercado sin necesidad de pasar los

numerosos test de seguridad, limitantes en cuanto a tiempo y costos (Gaggia y col., 2010).

Sin duda el futuro de los probióticos como aditivos dependerá en gran medida del desarrollo regulatorio en el área. Las exigencias en cuanto a la demostración de calidad, eficiencia y especialmente seguridad de las preparaciones probióticas para aves determinarán la oportunidad de desarrollo de nuevos productos con inserción en el mercado (Anadón y col., 2006).

### **3. Enfermedades causadas por enteropatógenos en aves**

Las enfermedades entéricas son relevantes en la industria avícola ya que causan pérdidas en la productividad, aumento de la mortalidad y se asocian a la contaminación de humanos a través de alimentos derivados (Patterson y Burkholder, 2003). Entre los enteropatógenos que afectan más frecuentemente a las aves se encuentran *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* y *Clostridium perfringens* (Doyle y Erickson, 2006; McReynolds y col., 2009). La colibacilosis, ocasionada por *Escherichia coli* y la salmonelosis, ocasionada por *Salmonella* spp., son las enfermedades bacterianas que causan mayores pérdidas económicas en la industria avícola y constituyen un riesgo de transmisión al hombre a través del consumo de alimentos derivados (Mor-Mur y Yuste, 2010; Lutful Kabir, 2010).

*Escherichia coli* es una bacteria oportunista que suele causar enfermedades en pollos inmunológicamente deprimidos. Hay cepas de *E. coli*, conocidas como *E. coli* patógena (APEC), que son capaces de causar colibacilosis debido a su capacidad invasiva. La infección en aves implica la colonización del tracto respiratorio, el paso a través del epitelio y la penetración de las bacterias a la mucosa de las vías respiratorias. La supervivencia y multiplicación de *E. coli* en el torrente sanguíneo, da lugar a una septicemia, que se desencadena en lesiones de múltiples órganos, por lo general pericarditis, saculitis, perihepatitis y peritonitis (Lutful Kabir, 2010). Desde el punto de vista económico, esta enfermedad representa un problema importante para la industria avícola en todo el mundo, causando pérdidas significativas debido a las tasas de conversión más bajas produciendo una pérdida de peso, altas tasas de mortalidad y de baja calidad del cadáver, con el consiguiente rechazo de la producción y el alto costo del tratamiento (Dziva y Stevens, 2008; Saberfar y col., 2008).



*Salmonella* es el agente infeccioso causal de la salmonelosis, enfermedad cuyas características se detallan a continuación.

### 3.1 Salmonelosis

Dentro del género *Salmonella* existen 2 especies, *bongori* y *enterica*, la última de las cuales contiene 6 subespecies *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (Brenner y col., 2000). De estas subespecies solo *S. enterica* subsp. *enterica* causa enfermedades en animales de sangre caliente (Uzzau y col., 2000). Las otras subespecies son comúnmente halladas en el medioambiente o asociadas a poiquilotermos estando menos frecuentemente relacionadas con enfermedades humanas (CFSPH, 2005).

Los serotipos de *Salmonella* se dividen en tres grupos basados en el rango de hospedadores que pueden colonizar: restringidos, adaptados al hospedador y ubicuos. Los serotipos restringidos se asocian casi exclusivamente a ciertas especies hospedadoras. Por ejemplo Typhi, Gallinarum y Abortusovis están relacionadas a enfermedades sistémicas en humanos, aves y ovinos respectivamente. Aquellos adaptados al hospedador causan típicamente enfermedades sistémicas en un número limitado de especies relacionadas pero pueden producir ocasionalmente enfermedades en otros. Por ejemplo Dublin y Choleraesuis causan enfermedades severas en ganado vacuno y en porcinos respectivamente, pero pueden infectar otros mamíferos incluyendo humanos. Las serovariedades ubicuas, como por ejemplo Typhimurium y Enteritidis, pueden ocasionar enfermedades sistémicas en una amplio rango de hospedadores, pero usualmente producen gastroenteritis autolimitante (Uzzau y col., 2000).

Las infecciones de aves con *Salmonella* son importantes tanto como causa de enfermedades en criaderos como por su transmisión a humanos a través de la contaminación de alimentos derivados (Lutful Kabir, 2010).

La diseminación de la infección por *Salmonella* en aves ocurre por transmisión horizontal mediante contaminación fecal de alimento, agua y/o camas. La infección ocurre frecuentemente por vía oral, aunque las vías nasal y cloacal son también consideradas importantes en la propagación la enfermedad. Asimismo puede haber transmisión vertical a través del ovario u oviducto infectados o del contacto de la superficie del

huevo con heces contaminadas y la posterior penetración del patógeno al interior del huevo (Kabir, 2009).

Las aves sufren 3 tipos de enfermedades asociadas a *Salmonella* sp.: pullorosis, tifosis aviar y paratífosis. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum es el agente etiológico de la tifosis aviar y la pullorosis que son causadas por las serovariedades Gallinarum y Pullorum, respectivamente. Asimismo varios serotipos móviles ubicuos altamente invasivos, tales como Typhimurium, son causantes de la enfermedad paratifoidea (Shivaprashad, 1997).

La tifosis aviar es una enfermedad hiperaguda, aguda o crónica que afecta principalmente a pollos adultos, mientras que la pullorosis afecta a pollos jóvenes de no más de 2 o 3 semanas de edad, tendiendo a hacerse crónica en adultos. Ambas enfermedades son indistinguibles hasta que el agente etiológico se aísla e identifica (Parveen y col., 2007). Los signos clínicos en polluelos de corta edad incluyen anorexia, diarrea, deshidratación, debilidad y alta mortalidad (Shivaprasad, 2000). En adultos la enfermedad tifoidea se manifiesta mediante anorexia, descenso en la producción de huevos, incremento de mortalidad y reducción de la fertilidad (Shivaprasad, 2000). En tanto que los pollos adultos que contraen pullorosis no exhiben síntomas clínicos (Shivaprashad, 1997). La enfermedad paratifoidea sólo presenta síntomas similares a los de la pullorosis en aves muy jóvenes, mientras que en aves adultas suele causar una infección asintomática.

A pesar de que la tifosis y pullorosis están ampliamente distribuidas mundialmente, la enfermedad ha sido prácticamente erradicada en aves comerciales en países desarrollados tales como Estados Unidos de América, Canadá y la mayoría de los países de Europa Occidental (Shivaprashad, 1997). Esto se ha logrado mediante la implementación de Programas de control que exigen buenas prácticas de manejo e higiene conjuntamente con la aplicación de test serológicos de rutina y políticas de sacrificio (Lutful Kabir, 2010).

También en los países latinoamericanos los progresos y mejoras en el manejo y la nutrición avícola que se han implementado en los últimos veinte años han reducido la prevalencia de la tifosis y la paratífosis. A pesar de esto *Salmonella* Gallinarum continúa siendo una causa constante de infecciones con tifosis aviar en aves de distinto tipo y su control ha resultado dificultoso. Asimismo *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y actualmente

también *S. Heidelberg* presentan alta prevalencia y resultan un serio problema de salud pública (SENASA, 2002).

En Latinoamérica *S. enterica* serovar Enteritidis encabeza la lista de patógenos emergentes y re-emergentes causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en las últimas dos décadas. En el período 1995-1999, *Salmonella* fue el segundo agente causal más importante (35.3 %) de brotes de ETA en América Latina y el Caribe. Durante el período 1993-2002 se registraron en Latinoamérica 1256 brotes de salmonelosis, que afectaron a 48334 personas y produjeron 15 muertes. El 29.2 % de los casos fue consecuencia del consumo de huevos o productos derivados y el 9.4 %, fue debido a la ingesta de carne de aves. El 9.8 % de los brotes fue causado por *Salmonella* Enteritidis y en el 85 % de los casos no se pudo determinar la serovariedad implicada (Fuente: Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos [SIRVETA]).

En Argentina durante el período 1993-2002 ocurrieron 60 brotes de salmonelosis que produjeron 889 enfermos y 4 muertos. Según un informe del Boletín epidemiológico Nacional publicado en 2006 las 5 serovariedades prevalentes en muestras de origen humano en Argentina en el período 2004-2005 fueron: *S. Enteritidis* (36.0 %), *S. Typhimurium* (20.5 %), *S. Infantis* (8.7 %), *S. Newport* (5.3 %) y *S. Agona* (4.9 %); siguiendo la misma tendencia que en años anteriores.

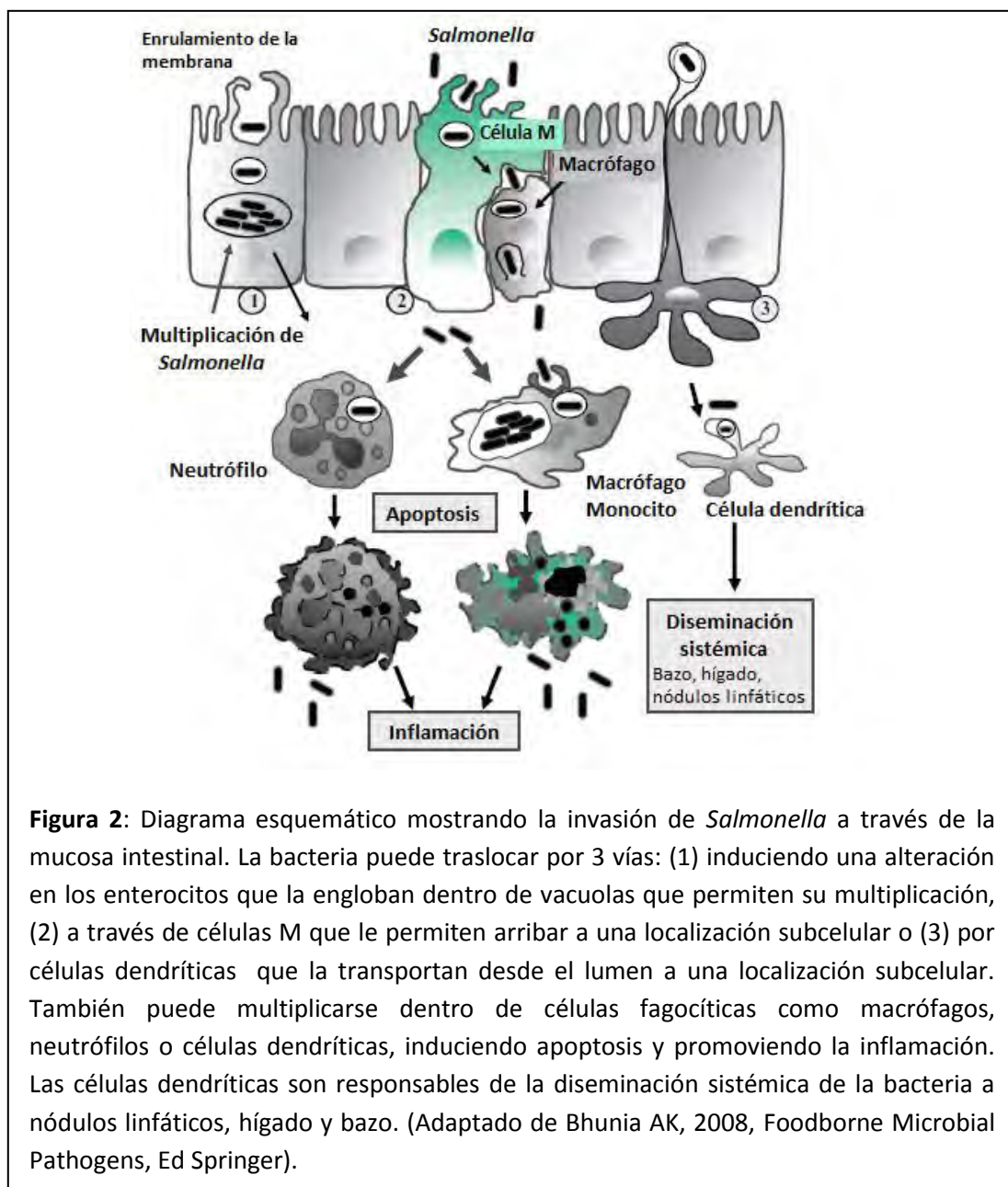
La mortalidad por salmonelosis en países desarrollados es poco frecuente (< 5 %) sin embargo en países en desarrollo con mayor frecuencia de enfermedades invasivas la mortalidad se encuentra entre 18 y 24 % (Chimalizeni y col., 2010).

### **3.2 Mecanismos de patogénesis de *Salmonella***

Para el desarrollo de la enfermedad es necesario que la bacteriana se localice en un ambiente adecuado, se adhiera, invada, se replique, resista a los mecanismos de defensa del hospedador y le ocasione daño.

La adhesión al epitelio intestinal es un importante factor de virulencia ya que permite a la bacteria resistir al fluido luminal. *Salmonella* presenta al menos cuatro tipos de fimbrias, con diferente especificidad de unión a superficies celulares y no celulares, que le permiten conseguir contacto estrecho con los enterocitos. La fimbria tipo 1 (Fim) se une a receptores  $\alpha$ -D-manosa en las células, la fimbria larga polar (Lpf) se une a células

de las Placas de Peyer, mientras que la fimbria codificada por plásmidos (Pef) y la fimbria agregativa delgada (Curli) le permiten su adhesión a células epiteliales intestinales. La fibra agregativa delgada interviene también en la autoagregación, que aumenta la supervivencia de la bacteria en presencia de sustancias inhibitorias. Además *Salmonella* presenta moléculas de adhesión tipo-lectina que se unen a receptores glicoconjugados Gal  $\beta$  (1-3) Gal NAc de los enterocitos (Bhunja, 2008). Estos sistemas de adhesión se expresan cuando las condiciones físico-químicas, tales como la temperatura, pH, osmolaridad y disponibilidad de nutrientes en el hospedador son las adecuadas (Figueroa Ochoa y Verdugo, 2005).



**Figura 2:** Diagrama esquemático mostrando la invasión de *Salmonella* a través de la mucosa intestinal. La bacteria puede traslocar por 3 vías: (1) induciendo una alteración en los enterocitos que la engloban dentro de vacuolas que permiten su multiplicación, (2) a través de células M que le permiten arribar a una localización subcelular o (3) por células dendríticas que la transportan desde el lumen a una localización subcelular. También puede multiplicarse dentro de células fagocíticas como macrófagos, neutrófilos o células dendríticas, induciendo apoptosis y promoviendo la inflamación. Las células dendríticas son responsables de la diseminación sistémica de la bacteria a nódulos linfáticos, hígado y bazo. (Adaptado de Bhunia AK, 2008, Foodborne Microbial Pathogens, Ed Springer).

La invasión de *Salmonella* a través de la mucosa intestinal ocurre preferentemente a través de las células M, rápidamente las destruye y luego infecta a células absortivas vecinas través de los dominios baso-laterales y a linfocitos subyacentes. Las células dendríticas pueden ser también un medio de internalización de este patógeno. Finalmente es capaz de invadir a través de la superficie apical de células absortivas del epitelio intestinal. En este caso la invasión implica desaparición de las microvellosidades de la célula epitelial y la inducción de cambios en el citoesqueleto de actina que causan el enrulamiento (ruffling) de la superficie celular y la inclusión del patógeno en vacuolas (Figura 2). El proceso de internalización de *Salmonella* esta mediado por el sistema de secreción tipo III codificado por la isla de patogenicidad 1 (SPI-1). A través de este sistema el patógeno envía numerosos efectores a la célula epitelial que inducen cambios en las mismas al interferir en sus vías de señalización (Figueroa Ochoa y Verdugo, 2005). Luego de la invasión *Salmonella* es capaz de sobrevivir y multiplicarse dentro del compartimento vacuolar de las células hospedadoras y utilizarlas para diseminarse por la superficie de la mucosa e iniciar una infección sistémica. Los mecanismos implicados en estos procesos están mediados por el sistema de secreción tipo III codificado por la isla de patogenicidad 2 (SPI-2) (Brumell y col., 2000).

La estrategia infectiva de *Salmonella* incluye su interacción con células del sistema inmune, estando adaptada a sobrevivir y replicarse en el compartimento vacuolar de las mismas. Por este motivo presenta mecanismos de virulencia sumamente complejos. Es la única bacteria descrita que contiene dos sistemas de secreción tipo III. Se estima, además, que el 4 % del cromosoma de *S. Typhimurium* (alrededor de 200 genes) son factores de virulencia. Estos factores incluyen cinco islas de patogenicidad, numerosas islotes de patogenicidad menores y al menos 1 plásmido de virulencia (Salama y Falow, 1999). Cabe destacar que si bien en los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la patogenia de esta bacteria y sus vías de regulación (Figueroa Ochoa y Verdugo, 2005; Valdez y col., 2009), debido a su importancia, los estudios continúan siendo de interés en la actualidad.

### **3.3 Métodos de control de salmonelosis en aves**

Un amplio rango de intervenciones se han sugerido para reducir el riesgo de contaminación de *Salmonella* en producción avícola, incluyendo la selección de

variedades de aves resistentes a la colonización, tratamientos para reducir la transmisión vertical, prácticas de sanidad para prevenir la contaminación en los criaderos y durante el transporte, la eliminación de patógenos en alimento y agua de bebida, el uso de aditivos en agua y alimento para crear medioambientes adversos para la colonización por el patógeno y tratamientos biológicos que inactivan directa o indirectamente al patógeno. Para lograr una exitosa reducción del patógeno en la industria avícola es necesaria una combinación de estas estrategias (Cox y Pavic, 2010).

Los principales vectores de *Salmonella* en aves son animales invasores, las camas, las excreciones, el agua y el alimento.

Artrópodos y roedores pueden actuar como transmisores de enteropatógenos. *Salmonella* se halla distribuida en moscas y en menor medida en escarabajos y ácaros. Si bien estos animales han sido implicados como vectores de este patógeno, existen pocos estudios a campo que indiquen la relevancia de esta forma de transmisión en el contexto de la producción (Wales y col., 2010). La aplicación de programas de control de insectos y roedores sumados a una buena higiene de las instalaciones son recomendadas para reducir esta forma de transmisión.

Respecto a las camas, el material del lecho puede ser tratado con distintos productos disponibles en el mercado que reducen la contaminación con patógenos. Ejemplos de estos productos son: PLT (Jones-Hamilton Products, Walbridge, OH) constituido por un ácido granular deshidratado de bisulfato de sodio (Line, 2002); Poultry Guard® (Oil Drip Company, Chicago, IL) un material arcilloso granular impregnado con ácido sulfúrico utilizado para contrarrestar la producción de amonio bajando el pH de las camas (Vicente y col., 2007), SoftAcid™ (Borregaard Lignotech, Rothschild, WI) una mezcla de lignosulfonato de sodio, ácido fórmico y ácido propiónico (Garrido y col., 2004), Microtreat P (Agtech Products, Waukesha, WI) un sistema biológico conteniendo bacterias que controlan la descomposición de los desechos de las camas (Wiard y col., 2001), entre otros.

El agua muchas veces proviene de fuentes naturales y no es de calidad potable. Se sugiere su tratamiento con agentes químicos, filtración u ósmosis reversa para asegurar que esté libre de patógenos. Existen asimismo acidificantes comerciales para el agua que contienen ácidos orgánicos que han mostrado ser efectivos en el control de

enteropatógenos y que reducen la formación de *biofilms* sin afectar negativamente a las aves (Chaveerach y col., 2004).

El alimento es particularmente un punto crítico de control de *Salmonella* en la producción avícola, siendo uno de los mayor vehículos de transmisión de este patógeno (Cox y Pavic, 2010). Los métodos de control de microorganismos en el pienso serán explicados más adelante (ver sección 4.2).

Otra medida de control preventivo es la vacunación, esta es una práctica difundida para el control de virus y patógenos en aves. Existen en el mercado vacunas más eficaces para combatir las serovariedades de *Salmonella Pullorum* y *Gallinarum* que serovariedades no específicas de hospedador que frecuentemente ocasionan intoxicaciones alimentarias (Barrow, 2007). Entre estas últimas el desarrollo de vacunas se ha limitado a las serovariedades prevalentes, tales como Enteritidis y Typhimurium (Cox y Pavic, 2010). Para combatir estas últimas se han desarrollado tanto vacunas inactivadas como vivas atenuadas, aunque las primeras son más utilizadas por los productores por ser consideradas más seguras (Barrow, 2007). Las vacunas inactivadas son comúnmente empleadas contra más de una serovariedad y actúan confiriendo inmunidad humoral. Mientras que las vacunas vivas son más efectivas en estimulación de inmunidad celular. Por esto se recomienda la utilización de los 2 tipos de vacunación combinados para lograr tratamientos preventivos más efectivos. El uso de vacunas es una herramienta útil para el control de la infección para reproductoras o aves de postura mientras que su uso es menos frecuente en pollos parrilleros (Soncini, 2011).

Otra estrategia para el control de *Salmonella* es el uso de fagos (virus que infectan específicamente a bacterias). Las ventajas de los fagos como agentes terapéuticos es que son específicos, efectivos en la destrucción de la bacteria blanco, resisten naturalmente en el medioambiente y autolimitan su replicación. Se ha demostrado que son efectivos en la reducción de la carga de *Salmonella* en pollos vivos (Higgins y col., 2005; Bielke y col., 2007). La principal limitación para la aplicación de este tipo de terapia es el temor a la emergencia de mutantes insensible a los bacteriófagos. Sin embargo se ha postulado que a diferencia de lo que ocurre con antibióticos, los fagos evolucionan constantemente para evadir las defensas de su hospedador (Atterbury y col., 2007). La fagoterapia es una estrategia de control prometedora aunque aún se encuentra en etapa de desarrollo.

También la inmunoterapia, es decir la utilización de anticuerpos específicos para controlar microorganismos, ha sido propuesta para el control de *Salmonella* sp. en aves. La administración de anticuerpos a pollos, que reconocen una o más serovariedades de *Salmonella*, provee inmunidad pasiva y reduce así la probabilidad de colonización. La inmunización de pollos utilizando determinados antígenos lleva no solo a la producción de anticuerpos circulantes en sangre, sino también a la acumulación de anticuerpos IgY en la yema de los huevos. Estos anticuerpos pueden ser extraídos de la yema y utilizados con fines profilácticos y en menor medida terapéuticos (Rahimi y col., 2007). Soluciones acuosas y polvos formulados por su deshidratación conteniendo anticuerpos IgY reducen la carga de *S. Enteritidis* en gallinas ponedoras (Berghaman y col., 2005; Rahimi y col. 2007).

Cabe destacar que entre los métodos de control de salmonelosis en aves, la alternativa que está cobrando cada vez mayor importancia para el tratamiento de este patógeno, es el uso de probióticos.

### **3.4 Probióticos para el control de *Salmonella* en aves**

Existen numerosos estudios que demuestran el efecto protector de los probióticos contra la colonización intestinal y daños causados por *Salmonella* tanto sobre células en cultivo *in vitro* como *in vivo*.

Experimentos *in vitro* han demostrado que la adhesión y/o la invasión de *Salmonella* sp. a células epiteliales intestinales puede ser reducida por BAL (Coconnier y col., 1993; Bernet y col., 1994; Wagner y col., 2002; Tsai y col., 2005; Golowczyc y col., 2007; Lin y col., 2008a; Dhanani y Gaudana, 2011; Yu y col., 2011) y levaduras (Zbinden y col., 1999; Martins y col., 2010). Este efecto se ha observado tanto al adicionar los probióticos a la monocapa previamente a la infección (efecto barrera) como cuando se coincuba el probiótico con el patógeno y luego se adicionan conjuntamente a la monocapa, mientras que el efecto es menor o inexistente cuando el probiótico se adiciona luego de la infección (reemplazo) (Dhanani y Gaudana, 2011; Yu y col., 2011).

La protección de la asociación de *Salmonella* a cultivos celulares por probióticos se ha atribuido fundamentalmente al impedimento físico no específico de la interacción de los patógenos con receptores de los enterocitos (Coconnier y col., 1993; Martins y col., 2010). Se ha demostrado además que esta interferencia puede reducir o inhibir la



expresión de genes implicados en la internalización del patógeno (Martins y col., 2010). También se han sugerido otros mecanismos tales como la competencia por los nutrientes, la modulación de la respuesta inmune y la producción de ácidos orgánicos y otros compuestos antimicrobianos como las bacteriocinas (Yu y col., 2011). Respecto a esto último, se ha reportado que la incubación de *Salmonella* sp. en sobrenadantes de cultivos de lactobacilos previamente a la infección reduce su capacidad de invadir cultivos celulares (Hudault y col., 1997; Golowczyc y col., 2007; Lin y col., 2008a). El ácido láctico está implicado en este efecto, aunque se ha demostrado que algunas cepas producen otros metabolitos que interfieren en la invasión de *Salmonella* (Makras y col., 2006). Entre ellos la proteína de capa-S, producida por *Lactobacillus kefir* secretada al medio de cultivo, puede enmascarar la superficie del patógeno evitando su interacción con los enterocitos (Golowczyc y col., 2007).

Estudios *in vivo* han demostrado el efecto protector de numerosos probióticos comerciales sobre la colonización de ciegos intestinales por *Salmonella*. Como ejemplos se pueden citar: Aviguard de composición indefinida, LevucellSC compuesto por *Saccharomyces cerevisiae*, Bactocell compuesto por *Pediococcus acidilactici* (Al-Zenki y col., 2009), FM-B11 (Ivesco, LLC, Springdale, AR) constituido por once BAL (Higgins y col., 2008), Toyicerin constituido por esporas de *Bacillus cereus* (Vila y col., 2009), Broilac de composición indefinida (Nuotio y col., 1992), Biomin compuesto por cepas de *Enterococcus* sp., *Pediococcus* sp., *Bifidobacterium* sp. y *Lactobacillus* sp. (Sterzo y col., 2007).

También se ha reportado que algunos probióticos son capaces de prevenir la invasión de este patógeno a órganos internos. Estrada y col. (2009) demostraron la capacidad de un probiótico de composición definida de disminuir la invasión de *Salmonella* Enteritidis a bazo e hígado y de reducir su transmisión horizontal en aves de la raza Leghorn. Revolledo y col. (2009) hallaron asimismo que el probiótico comercial Aviguard es capaz de reducir la invasión de *Salmonella* Typhimurium a bazo e hígado, mientras que Nuotio y col. (1992) reportaron este mismo efecto para el probiótico comercial Broilac en pollos infectados con *S. Enteritidis*.

## 4. Uso de antimicrobianos en la conservación de pienso para aves

### 4.1 Contaminación de pienso

El alimento es el principal componente del total de costos de la producción de carne y huevos en la industria aviar. Es asimismo el principal agente mediante el cual las aves son expuestas a una amplia variedad de factores a través del tracto gastrointestinal.

El pienso para aves puede servir como sustrato para el desarrollo de una amplia variedad de microorganismos. Algunos de estos microorganismos provienen de la materia prima, sobre todo de los cereales, mientras que otros se introducen durante la elaboración y el almacenamiento del alimento.

La diversidad microbiológica del pienso es variada dependiendo del tipo de alimento, los tratamientos de procesado y las condiciones de almacenamiento. Si bien algunas bacterias pueden encontrarse en el pienso para aves, debido a su resistencia a bajas actividades acuosas los hongos son los principales contaminantes del mismo. Algunos hongos se adaptan a la baja cantidad de humedad disponible y crecen activamente en el alimento, mientras que otros producen esporas o entran en estado de latencia hasta que la humedad es suficientemente alta para su proliferación.

El almacenamiento del alimento en los criaderos bajo condiciones no adecuadas, tales como falta de ventilación y temperatura y humedad elevadas, aún por períodos de tiempo breves puede conducir a la rápida proliferación de hongos filamentosos contaminantes (Labuda y Tančinová, 2006).

Los hongos pueden afectar negativamente la calidad del alimento mediante la alteración de sus propiedades nutricionales y la generación de daño físico. Por otra parte el consumo de alimentos contaminados por hongos puede ocasionar en las aves lesiones con distinta severidad, dependiendo del estado inmunológico del ave y de la especie fúngica, produciendo en algunos casos efectos histopatológicos significativos y atrofia de los principales órganos del sistema inmune, aumentando así la susceptibilidad a contraer enfermedades (Rochette y col., 2003). Si bien los hongos en sí mismos pueden ser causantes de enfermedades, los mayores daños son ocasionados por las toxinas que producen. Las micotoxinas causan importantes pérdidas económicas en la industria avícola reduciendo la tasa de crecimiento, los porcentajes de nacimiento, la eficiencia alimentaria y la inmunidad contra enfermedades (Rawal y col., 2010). Se han reportado

pérdidas millonarias debidas a la contaminación por micotoxinas, así como también pérdidas monetarias adicionales en esfuerzos por reducir la contaminación (CAST, 2003). El problema de las toxinas fúngicas no sólo incide en la economía de la producción avícola, sino que residuos de micotoxinas consumidas por animales pueden aparecer en los productos derivados de los mismos destinados al consumo humano. La ingesta de micotoxinas en humanos puede causar desde depresión del sistema inmunológico, irritación y alergias hasta severos problemas hepáticos e incluso pueden tener efecto hepatocarcinogénico (Dersjant-Li y col., 2003).

#### **4.2 Métodos de control de microorganismos en el pienso**

Diversas estrategias son llevadas a cabo con el fin de controlar la contaminación fúngica y bacteriana del alimento para aves. Entre los métodos físicos se incluyen el secado rápido para disminuir la disponibilidad de agua, el almacenamiento por períodos breves de tiempo, el tratamiento térmico y las radiaciones. En particular el tratamiento térmico que se lleva cabo durante la extrusión o peletización del alimento, a temperaturas entre 70 y 90 °C, es un método efectivo para reducir los niveles de patógenos y desnaturalizar micotoxinas (Ekperigin y col., 1990; Buser y Abbas, 2002). La radiación ionizante también ha sido investigada como método para disminuir la carga microbiana del alimento, sin embargo el nivel de radiación requerido para lograr efectividad pueden destruir la tiamina y la riboflavina así como algunos amino ácidos, afectando negativamente la calidad del alimento (Maciorowski y col., 2004). También se ha propuesto el uso de radiación ultravioleta para eliminar hongos e inactivar micotoxinas previamente al almacenamiento del alimento (Maciorowski y col., 2007).

En el pasado, los antibióticos eran ampliamente utilizados como aditivos en alimentos con la finalidad de promover el crecimiento y reducir su carga microbiana. Sin embargo, debido a su implicancia en la diseminación de genes de resistencia, el uso de profiláctico de antibióticos ha sido prohibido en Australia, Estados Unidos y Europa. Como alternativas de conservantes químicos para el control de microorganismos en alimentos para aves se han propuesto diversas sustancias, tales como ácidos orgánicos, ácidos minerales, isopropil alcohol, aldehídos, trisodio fosfato, clorato, 2-nitrofenol (Doyle y Erickson, 2006; Maciorowski y col., 2007). Las principales restricciones para la aplicabilidad de compuestos es que no deben ser corrosivos ni dañar los equipos

empleados para producir el alimento, no deben tener efectos negativos en la salud o crecimiento del animal y deben ser seguros para el hombre (Doyle y Erickson, 2006). Bajo estas limitaciones los compuestos más ampliamente empleados a nivel mundial son los ácidos orgánicos, entre ellos los ácidos benzoico, sórbico, nitroso, sulfuroso, acético y propiónico; o menos frecuentemente sus ésteres (Pitt y Hocking, 2009). Existen en el mercado numerosos aditivos comerciales a base de ácidos orgánicos. Se presentan algunos como ejemplo en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Aditivos comerciales a base de ácidos orgánicos utilizados en la preservación de alimentos para aves.

Nombre comercial	Información general	Referencias
<b>Adimix® C</b> (INVE Nutri-Ad, Belgium)	Sal sódica de ácido n-butírico disponible en forma de polvo o microcapsulas	Van Immerseel y col. (2005)
<b>Salcurb™</b> (Kemin, Des Moines, IO)	Mezcla de ácidos orgánicos (propiónico y benzoico) y formaldehído	Pumfrey y Nelson (1991)
<b>Galliacid™</b> (Jefo, Quebec, Canadá)	Triglicérido encapsulado con ácidos orgánicos (ácido fumárico y fórmico, sales de propionato y el sorbato) diseñado para su liberación intestinal	Van Immerseel y col. (2005)
<b>Salkil™</b> (KiotechAgil, Reading, UK)	Es una combinación de ácidos carboxílicos y sus sales de amonio en un soporte único que ofrece protección contra la contaminación por enteropatógenos	Hinton y Linton (1988)

El uso de estos compuestos se considera seguro y se hallan permitidos. Sin embargo recientemente se ha descrito la adquisición de resistencia por hongos y levaduras a algunos ácidos empleados como conservantes, tales como el sórbico y el benzoico (Brul y Coote, 1999; Loureiro, 2000; Sanglard, 2002). Se ha descrito que especies pertenecientes a *Penicillium* sp., *Saccharomyces* sp. y *Zygosaccharomyces* sp. pueden crecer en presencia de sorbato de potasio (Davidson, 2001) y que las especies de mohos capaces de degradar sorbato se encuentran en aumento (Nielsen y de Boer, 2000). Asimismo la levadura *Zygosaccharomyces bailii* presenta notable capacidad de resistir al

ácido benzoico, siendo capaz de crecer y fermentar licores de frutas de pH 3 conteniendo 800 mg/L de este ácido. También se han descrito aislados de *Penicillium roqueforti* resistentes al ácido benzoico (Nielsen y de Boer, 2000). Se ha reportado también que la levadura *Moniliella acetoabutans* es tolerante al ácido acético, pudiendo crecer en presencia de 4 % y sobrevivir en presencia de 10 % de este ácido (Pitt y Hocking, 2009).

En base a la creciente documentación sobre la aparición de resistencia y dada la presión pública por la reducción en el uso de conservantes químicos y aditivos en alimentación humana y animal se ha previsto que el uso de algunos conservantes actualmente aceptados podría ser restringido en corto plazo (Brul y Coote, 1999).

Esto ha impulsado el interés en la biopreservación de alimentos, es decir, la preservación de alimentos empleando sustancias naturales. Recientemente se han desarrollado numerosos antimicrobianos naturales de distintos orígenes, incluyendo compuestos animales como lisozima, lactoferrina, quitosano, defensinas y pleurocidina; productos derivados de plantas como saponinas, flavonoides, aceites esenciales y fitoalexinas; y metabolitos microbianos, tales como bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos (Tiwari y col., 2009). La biopreservación, asimismo contempla el uso de microorganismos, principalmente bacterias ácido lácticas con una larga historia de uso seguro, para extender la vida útil de los alimentos o mejorar su seguridad (Garrote y col., 2010b).

#### **4.3 Uso de bacterias ácido lácticas y sus metabolitos como conservantes de pienso**

Dado que las bacterias ácido lácticas (BAL) prosperan en medioambientes ricos en nutrientes, se hallan presentes naturalmente en numerosos alimentos. Las mismas han sido utilizadas por siglos para mejorar el almacenamiento de alimentos y en el ensilado de diferentes cultivos para alimentación animal. Cepas específicas de BAL son además frecuentemente incluidas en productos probióticos en los que ejercen efectos benéficos para el consumidor. Los alimentos fermentados han sido producidos desde tiempos antiguos, aún cuando la implicancia de los microorganismos en el proceso no fue comprendida hasta mitad del siglo XIX con el desarrollo de la microbiología (Caplice y Fitzgerald, 1999). La fermentación por BAL es esencial, por ejemplo, para la producción de queso, yogurt, salsas fermentadas y chucrut. Hoy en día el principal objetivo de la

adición de BAL no es la conservación en sí misma, sino otorgarle al alimento características deseables tales como aroma o textura. En la producción de alimentos animales la fermentación por BAL es probablemente el proceso más importante en el ensilado (McDonald y col., 1991).

Debido que las BAL se encuentran naturalmente en numerosos sistemas alimentarios y han sido parte de la dieta humana por siglos, pueden ser consideradas microorganismos seguros para el consumidor. Las mismas tienen potencial para extender su uso en biopreservación de alimentos para animales.

Las bacterias pueden proteger el alimento de microorganismos deteriorantes por competencia por los nutrientes o por la producción de metabolitos antagónicos (Schillinger y col., 1996). El principal efecto de las BAL en la preservación es mediante la producción de ácido láctico, lo que baja el pH inhibiendo así a numerosos microorganismos (Brul y Coote, 1999). Además de la producción de ácido láctico, las BAL producen otras sustancias antimicrobianas, tales como ácido acético, etanol, peróxido de hidrógeno, diacetilo, reutenina, reuteriicina y bacteriocinas, que juegan un importante rol en su capacidad de actuar como preservantes (Lindgren y Dobrogosz, 1991; Caplice y Fitzgerald, 1999). Se han descrito asimismo numerosos compuestos de bajo peso molecular producidos por BAL que presentan actividad antifúngica (Tabla 3).

**Tabla 3:** Compuestos químicos de bajo peso molecular antifúngicos producidos por bacterias ácido lácticas

Compuesto identificado	Cepa productora	Referencia
Ácido 4- hidroxifenil-láctico	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lavermicocca</i> y col. (2000)
Ácido 3-fenil-láctico	21B	
Ácido 3-hidroxidecanoico	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Sjögren y col. (2003)
Ácido 3-hidroxidodecanoico	MiLAB14	
Ácido 3-hidroxitetradecanoico		
Ácido 3-hidroxí-5-cis-dodecenoico		
ciclo (Gly-Leu) metilidantoina mevalonolactona	<i>Lactobacillus plantarum</i> VTT E-78076	Niku-Paavola y col. (1999)
Ácidos caproico, propiónico, butírico, acético, fórmico y n-valérico	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> CB1	Corsetti y col. (1998)
Peptido, ácido fenil-láctico, ciclo(Phe-Pro), ciclo(Phe-OH-Pro), reuterina	<i>Lactobacillus coryniformis</i> Si3	Magnusson y col. (2003), Magnusson y Schnüner (2001)

Las BAL también pueden producir compuestos proteicos (Gourama y Bullerman, 1997; Okkers y col., 1999; Magnusson y Schnürer, 2001) y sustancias aún no caracterizadas químicamente (Makanjuola y Springham, 1992; Roy y col., 1996; Florianowicz, 2001; Laitila y col., 2002; De Muynck y col., 2004 Schwenninger y col., 2005; Hatew y col. 2011) que presentan amplia capacidad antifúngica.

La aplicación de metabolitos producidos por BAL ha sido analizada para la conservación de productos panificados (Laverimocca y col., 2003; Valerio y col., 2008; Geréz y col., 2009), carnes (Kostrzynska y Bachand, 2006; Vásquez y col., 2009) productos lácteos (Lee y col., 2008) y vegetales (Sathe y col., 2007). Su utilidad en la conservación de alimentos animales ha sido sugerida por numerosos autores (Schnüner y Magnusson, 2005; Ström, 2005; Parada y col., 2007; Hatew y col., 2011). Sin embargo los estudios sobre la aplicación de BAL o sus metabolitos como ingredientes en la conservación de pienso para aves se limitan a los trabajos de Murry y col. (2004) y Heres y col. (2003) que sugieren que la adición de estas cepas de BAL a alimento para aves podría ser útil para controlar el crecimiento de enteropatógenos en los mismos.

La adición de BAL o sus metabolitos a alimentos para aves podría ser además interesante para el control de hongos y micotoxinas en los mismos. Se ha demostrado que algunas BAL son capaces de inhibir la producción de micotoxinas a través de la inhibición del crecimiento del hongo y de la producción de metabolitos específicos (Dalié y col., 2010). Asimismo se ha encontrado que un gran número de BAL presenta capacidad de capturar aflatoxinas en la superficie celular pudiendo actuar de esta forma como descontaminantes de la toxina (Garrote y col., 2010b).

## **5. El kefir**

### **5.1 Descripción del producto**

El kefir es una bebida láctea fermentada artesanal viscosa, de sabor ácido, levemente efervescente y con un aroma característico (Garrote y col., 2001). Es producida por fermentación de leche con gránulos de kefir. Estos son masas gelatinosas, irregulares, color blanco o ligeramente amarillento, y consistencia elástica. Su tamaño es variable oscilando desde pocos milímetros a 2 o 3 centímetros de diámetro y su forma semejante a las inflorescencias de coliflor (Figura 3).



**Figura 3:** Aspecto de los gránulos de kefir.

En los gránulos, se encuentran inmersas bacterias ácido lácticas ( $10^8$ - $10^9$  UFC/g de gránulo), levaduras ( $10^7$ - $10^8$  UFC/g de gránulo) y bacterias ácido acéticas ( $10^5$ - $10^6$  UFC/g de gránulo) (Koroleva 1991; Garrote y col., 2001). Cuando los gránulos de kefir son adicionados a la leche, parte de los microorganismos pasan a ella donde se multiplican y producen metabolitos que otorgarán a la leche fermentada sus características químicas y físicas particulares. La composición del kefir, así como sus características organolépticas están sujetas a variaciones regionales. Está documentado que éstas variaciones pueden deberse a factores tales como el origen y almacenamiento de los gránulos de kefir, el tipo leche utilizada, así como a las condiciones de elaboración del producto siendo relevantes la relación gránulo-leche y la temperatura de fermentación (Witthuhn y col., 2005; Latorre García y col., 2007).

No se conocen los mecanismos por los cuales se originaron los gránulos de kefir (Koroleva, 1988). Estos se forman solamente a partir de otros gránulos preexistentes y en el laboratorio no ha sido posible formar un nuevo gránulo partiendo de la asociación de cepas aisladas de los mismos (Botazzi y col. 1994). Se cree que los gránulos se originaron debido a prácticas de las tribus de la región del Cáucaso, quienes dejaban fermentar la leche en odres hechos de estómago de animales donde la transportaban. Sin llegar a consumir totalmente el producto, el saco era nuevamente recargado con leche, repitiendo el proceso durante mucho tiempo. Esta práctica puede haber permitido la reunión de los microorganismos y formación de la asociación simbiótica propia del kefir (Bottazi y Bianchi, 1980).



La composición microbiológica del kefir es compleja y se han aislado una gran variedad de microorganismos tanto de estos como de la leche fermentada (Tablas 4 y 5).

**Tabla 4:** Bacterias encontradas en los gránulos de kefir y leche fermentada. Adaptado de Golowcyc (2008).

<b>Lactobacilos</b>	
<i>Lactobacillus kefir</i> <b>a,c,j,n,o,p,r, u, v</b>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <b>a,h,p</b>
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> <b>l,n,p, u, v,w</b>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> <b>a,r</b>
<i>Lactobacillus kefirgranum</i> <b>n</b>	<i>Lactobacillus casei</i> <b>h, v</b>
<i>Lactobacillus parakefir</i> <b>n,o</b>	<i>Lactobacilli paracasei</i> <b>p</b>
<i>Lactobacillus brevis</i> <b>g,h,p,r</b>	<i>Lactobacillus fructivorans</i> <b>k</b>
<i>Lactobacillus plantarum</i> <b>o,p</b>	<i>Lactobacillus hilgardii</i> <b>k</b>
<i>Lactobacillus helveticus</i> <b>a,b,h, v</b>	<i>Lactobacillus fermentum</i> <b>r</b>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <b>g,p,r</b>	<i>Lactobacillus viridescens</i> <b>r</b>
<i>Lactobacillus gasserii</i> <b>r</b>	<i>Lactobacillus crispatus</i> <b>s</b>
<b>Lactococos</b>	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <b>a,c,e,f,g,h,k,o,r</b>	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <b>a,e,f</b>	
<b>Streptococos</b>	
<i>Streptococcus thermophilus</i> <b>e,h</b>	
<i>Streptococcus durans</i> <b>t</b>	
<b>Enterococos</b>	
<i>Enterococcus durans</i> <b>d*,e*</b> (descrita como <i>Streptobacterium durans</i> en ref. <b>d</b> ; descrita como <i>Streptococcus durans</i> en ref. <b>e</b> )	
<b>Leuconostoc</b>	
<i>Leuconostoc</i> sp. <b>r</b>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <b>a,b,g*,o, s, u, v</b> (descrita como <i>Leuconostoc kefir</i> en ref. <b>g</b> )	
<b>Bacterias ácido acéticas</b>	
<i>Acetobacter</i> sp. <b>o</b>	<i>Acetobacter aceti</i> <b>a,d</b>
<i>Acetobacter pasteurianus</i> <b>g</b>	
<b>Otras bacterias</b>	
<i>Bacillus</i> sp. <b>r</b>	<i>Micrococcus</i> sp. <b>r</b>
<i>Bacillus subtilis</i> <b>g</b>	<i>Escherichia coli</i> <b>r, u</b>
<i>Pseudomonas</i> spp. <b>u, v</b>	
<b>a</b> Koroleva (1991) ; <b>b</b> Lin y col. (1999); <b>c</b> Pintado y col. (1996); <b>d</b> Rosi y Rossi (1978); <b>e</b> Yüksesdag y col. (2004); <b>f</b> Dousset y Caillet 1993; <b>g</b> Ottogalli y col. (1973); <b>h</b> Simova y col. (2002); <b>j</b> Kandler y Kunath (1983); <b>k</b> Yoshida y Toyoshima (1994); <b>l</b> Fujisawa y col. (1988); <b>n</b> Takizawa y col. (1994); <b>o</b> Garrote y col. (2001); <b>p</b> Santos y col. (2003); <b>r</b> Angulo y col. (1993); <b>s</b> Garbers y col. (2004); <b>t</b> Yuksekdag y col. (2004); <b>u</b> Chen y col. (2008); <b>v</b> Jianzhong y col. (2009); <b>w</b> Magalhães y col. (2010)	

**Tabla 5:** Levaduras encontradas en los gránulos de kefir y leche fermentada. Adaptado de Golowczyc (2008).

<i>Kluyveromyces marxianus</i> <b>a,b,g,h,i,j,k,n,o,p,q</b>	<i>Candida friedrichii</i> <b>n</b>
<i>Kluyveromyces lactis</i> <b>ñ</b>	<i>Candida pseudotropicalis</i> <b>f</b>
<i>Saccharomyces sp.</i> <b>k</b>	<i>Candida tenuis</i> <b>f</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <b>a,d,e,g,j,m,n,o,q</b>	<i>Candida inconspicua</i> <b>g</b>
<i>Saccharomyces unisporus</i> <b>c,h,j,m</b>	<i>Candida maris</i> <b>g</b>
<i>Saccharomyces exiguus</i> <b>l*</b>	<i>Candida holmii</i> <b>j,m</b>
(descrita como <i>Torulopsis holmii</i> en <b>ref. l</b> )	<i>Candida lambica</i> <b>j</b>
<i>Saccharomyces turicensis</i> <b>h,p</b>	<i>Candida tannotelerans</i> <b>e</b>
<i>Saccharomyces delbrueckii</i> <b>d</b>	<i>Candida valida</i> <b>e</b>
<i>Saccharomyces dairensis</i> <b>n</b>	<i>Candida albicans</i> <b>m</b>
<i>Saccharomyces humaticus</i> <b>ñ</b>	<i>Candida kefir</i> <b>a,j,n</b>
<i>Torulasporea delbrueckii</i> <b>a,h,m</b>	
<i>Brettanomyces anomalus</i> <b>h</b>	
<i>Issatchenkia occidentalis</i> <b>j</b>	
<i>Issatchenkia orientalis</i> <b>ñ</b>	
<i>Pichia fermentans</i> <b>b,m,n,p</b>	
<i>Kazachstania exigua</i> <b>o</b>	
<i>Kazachstania unispora</i> <b>o,q</b>	

**a** Koroleva (1991); **b** Lin y col. (1999); **c** Pintado y col. (1996); **d** Rosi y Rossi (1978); **e** Dousset y Caillet (1993); **f** Ottogalli y col. (1973); **g** Simova y col. (2002); **h** Wyder y col. (1997, 1999); **i** Yoshida y Toyoshima (1994); **j** Engel y col. (1986); **k** Garrote y col. (2001); **l** Iwasawa y col. (1982); **m** Angulo y col. (1993); **n** Rohm y col. (1992); **ñ** Latorre Garcia y col (2007); **o** Jianzhong y col. (2009); **p** Wang y col. (2008), **q** Magalhães y col. (2010)

El kefir se encuentra descrito en el Código Alimentario Argentino, en el apartado de Leches Fermentadas, como: “Cultivo preparado a partir de gránulos de kefir, *Lactobacillus kefir*, especies del género *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Acetobacter* que crecen en una estrecha relación específica. Los gránulos de kefir están constituidos tanto por levaduras fermentadoras de lactosa (*Kluyveromyces marxianus*) como levaduras no fermentadoras de lactosa (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces exiguus*)”.

Actualmente su consumo es popular en distintos países del este europeo. En algunos de estos países, en EEUU y en Canadá, su producción alcanza escala industrial y se comercializa en el mercado. En Argentina se elabora artesanalmente (Garrote, 2000).

## 5.2 Propiedades funcionales

El kefir presenta propiedades benéficas para la salud que se atribuyen a la presencia de una microbiota compleja así como a sus productos metabólicos. Dentro de estos productos se pueden mencionar: ácidos orgánicos, vitaminas (fundamentalmente del grupo B), etanol, dióxido de carbono, acetaldehído, diacetilo, proteínas de superficie de algunos microorganismos que se liberan al medio (capa S), y un exopolisacárido (kefiran) (Guzel-Seydim y col., 2011). Las propiedades funcionales y probióticas del kefir han sido estudiadas por numerosos autores y se resumen a continuación los hallazgos más relevantes.

**Propiedades antimicrobianas.** Garrote y col. (2000) estudiaron la actividad antibacteriana del kefir, demostrando la capacidad inhibitoria de sobrenadantes de leche fermentada contra bacterias Gram (+) y Gram (-). Otros autores también demostraron actividades antibacterianas de sobrenadantes de productos fermentados con kefir o con microorganismos aislados a partir de ellos (Brialy y col., 1995; Santos y col., 2003; Yüksekdag y col., 2004; Rodrigues y col., 2005). Kakisu y col. (2007) probaron que el kefir disminuye la viabilidad y la germinación de esporas de *Bacillus cereus*. También se demostró su actividad antifúngica (Cevikbas y col., 1994; Ismaiel y col., 2011). Las propiedades inhibitorias del kefir han sido asociadas fundamentalmente a su contenido de ácidos orgánicos (Garrote y col., 2000), aunque se ha sugerido que podrían estar involucradas otras moléculas como peróxido de hidrógeno, acetaldehído, dióxido de carbono y bacteriocinas (Powell y col., 2007).

**Antagonismo contra patógenos intestinales.** Estudios *in vitro* sobre células epiteliales intestinales han demostrado que microorganismos aislados de kefir poseen capacidad de antagonizar el efecto de patógenos intestinales, tales como *Escherichia coli* *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. por distintos mecanismos.

Se ha probado que cuando *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, aislado de kefir, es incubado sobre cultivos de la línea celular Hep-2 previene la unión *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y minimiza las alteraciones causadas por el patógeno sobre los enterocitos. Este efecto no es dependiente de la viabilidad del probiótico y no puede ser explicado por exclusión competitiva (Hugo y col., 2008). Estudios posteriores demostraron que el antagonismo de esta cepa sobre la virulencia de *E. coli* se relaciona

con su capacidad de inhibir los efectos citotóxicos de la toxina Shiga 2 producida por EHEC (Kakisu, 2010). También se ha demostrado la capacidad de BAL (*L. plantarum* 83114 y *Lactococcus lactis* 8221) y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* 8112 y *Kluyveromyces marxianus* 8154) aislados de kefir de prevenir la invasión de *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri* a células en cultivo Hep-2 y de reducir los daños celulares causados por el patógeno (Bolla, 2010; Kakisu, 2010). Cepas de *Lactobacillus kefir* son también capaces de inhibir la adhesión e invasión de *Salmonella enterica* serovar. Typhimurium a células Caco-2/TC7, a través de la liberación al medio de cultivo de proteínas de capa-S que interactúan con estructuras de superficie del patógeno (Golowczyc y col., 2007).

**Modulación de la respuesta inmune.** Se ha propuesto que la modulación del sistema inmune sería uno de los mecanismos por los cuales las bacterias probióticas podrían ejercer sus efectos benéficos para la salud del hospedador (Gill y Rutherford, 2001; De Simone, 2005). Esto podría deberse a la actividad de los microorganismos por sí mismos (Cross, 2002) o a los péptidos bioactivos formados durante el proceso fermentativo y/o digestivo, ya que se ha demostrado la actividad biológica que presentan algunos de estos péptidos, incluyendo la modulación de la respuesta inmune en modelos animales (Gill y col., 2000; LeBlanc y col., 2004). Además, de acuerdo a la evidencia presentada en los últimos años, los polisacáridos presentes en el producto fermentado podrían tener implicancia en la modulación de la respuesta inmune, habiéndose demostrado este efecto para el kefirán (Vinderola y col., 2005, 2006b, 2006c; Medrano y col., 2011).

**Inhibición del crecimiento de tumores.** Se ha comprobado que la ingesta oral de kefir produce una reducción del crecimiento de tumores en ratones, este efecto se ha asociado con la inducción de procesos apoptóticos de las células tumorales y con la respuesta inmune inducida por componentes de la fracción soluble de kefir, particularmente polisacáridos (Shiomi y col., 1982; Liu y col., 2002; Hlastan-Ribič y col., 2005; De Moreno y col., 2007).

**Metabolismo del colesterol.** Gránulos de kefir de distintos orígenes pueden reducir los niveles de colesterol presentes en leche hasta 62 % luego de su incubación por 24 h a 20 °C (Vujicic y col., 1992). Además, *Lactobacillus acidophilus* CU 673 aislado de kefir presenta capacidad de asimilar colesterol (Yoon y col., 1999) y *Kluyveromyces marxianus*

es capaz de capturarlo en su pared celular (Yoshida y col., 2005). Sin embargo, estudios *in vivo* arrojan resultados contradictorios respecto al efecto anticolesterolémico del kefir. Liu y col. (2006) mostraron que el kefir, producido en leche de vaca y de soja, disminuye la concentración de colesterol y de triglicéridos en suero en hámster. Sin embargo Urdaneta y col. (2007) hallaron un pequeño incremento en los niveles de colesterol y triacilglicerol en ratas que consumieron kefir. St-Onge y col. (2002) describieron que el consumo de kefir en sujetos con hipercolesterolemia no produjo efecto alguno sobre los niveles de colesterol total, y tampoco sobre la concentración de colesterol LDL, colesterol HDL y triglicéridos. En consecuencia, el efecto hipocolesterolémico del kefir está en discusión.

**Efecto antihipertensivo.** Quirós y col. (2005) revelaron que kefir elaborado a partir de leche de cabra inhibe a la enzima transformadora de la angiotensina (ACE) *in vitro* por la presencia de péptidos de bajo peso molecular producidos por la proteólisis durante la fermentación. También se ha descrito que la administración de kefir reduce la actividad ACE en suero en ratas (Maeda y col., 2004).

**Reducción de los síntomas de la intolerancia a la lactosa.** La intolerancia a la lactosa es la incapacidad de digerir completamente la lactosa asociada con una actividad insuficiente de la enzima  $\beta$ -galactosidasa intestinal. Este síndrome afecta a aproximadamente un 75 % de la población adulta mundial (Scrimshaw y col., 1988). El kefir presenta actividad  $\beta$ -galactosidasa que permanece cuando el producto es consumido (De Vrese y col. 1992). Estudios llevados a cabo en humanos indican que el consumo de kefir es capaz de mejorar la digestibilidad de la lactosa (Hertzler y Clancy, 2003).

### 5.3 Fermentación de suero con gránulos de kefir

El uso de gránulos de kefir para fermentar suero de quesería fue propuesto por primera vez por Rimada y Abraham (2001). Estos autores demostraron que los gránulos aumentan su biomasa en suero desproteinizado, lo acidificaban, reducen su concentración de lactosa y liberan polisacáridos al medio. Asimismo describieron que la producción de polisacáridos y el crecimiento de los gránulos en este sustrato se ven afectados por la temperatura de fermentación.

Recientemente Magalhães y col. (2010) evaluaron la estabilidad de la comunidad microbiana de los gránulos de kefir al cambiar de sustrato de leche a suero, determinando que no había variaciones en la estructura externa del gránulo, analizada por microscopía confocal empleando sondas fluorescentes, ni en los perfiles DGGE de bacterias y levaduras. En trabajos más recientes estos autores describieron que la acidificación y la producción de ácidos orgánicos y de compuestos volátiles son similares en leche y suero fermentados con gránulos de kefir (Magalhães y col., 2011a, 2011b).

También se ha estudiado el empleo de microorganismos aislados de kefir para fermentar suero. Mazaheri Assadi y col. (2008) analizaron la composición química y la aceptabilidad de los productos obtenidos de la fermentación de suero con 6 cepas de bacterias ácido lácticas y 3 cepas de levaduras aisladas de kefir, así como de cultivos mixtos combinando estas cepas en distintas proporciones. Hallaron que el producto obtenido empleando cepas aisladas presentaba baja acidez y efervescencia y no se asemejaba al kefir tradicional, mientras que algunas combinaciones de cepas permitieron la obtención de productos con características organolépticas aceptables semejantes a las del suero fermentado con gránulos de kefir.

Investigadores de los Departamentos de Química de la Universidad Aristotélica de Thessaloniki y de la Universidad de Patras han trabajado intensamente en los últimos 6 años en el desarrollo de productos a base de suero por fermentación con cultivos de kefir. Estos autores utilizan como *starters* “células prensadas húmedas de kefir” que obtienen cultivando kefir comercial en medios sintéticos. La composición microbiológica del kefir comercial que emplean y del *starter* que desarrollan no se halla caracterizada en ninguna de sus publicaciones, estando las mismas sesgadas hacia la optimización de procesos para obtener los productos deseados y la caracterización química de los productos obtenidos.

Varias aplicaciones han sido propuestas para la valorización de suero empleando gránulos de kefir. Entre ellas podemos mencionar la producción de alcohol, polisacáridos, bebidas fermentadas, leudantes para panificación, *starters* para la producción de queso y proteínas celulares.

**Alcohol.** La conversión de lactosa en etanol ha sido una de las estrategias más consideradas como solución para la bio-remediación del suero y el permeado de suero.

Se han propuesto para tal fin levaduras fermentadoras de lactosa como *Kluyveromyces marxianus* y cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* (Guimarães y col., 2010). Por poseer levaduras fermentadoras de lactosa, se ha sugerido el empleo de gránulos de kefir en la producción de alcohol a partir de suero (Athanasiadis y col., 2002; Kourkoutas y col., 2002; Koutinas y col., 2007). Kourkoutas y col. (2002) estudiaron la producción de etanol a partir de suero adicionado con 1% de extracto de pasas de uva y melasa empleando levaduras de kefir inmovilizadas en un soporte de celulosa deslignificado. La productividad y la concentración de etanol y azúcares residuales fueron aceptables para la producción de alcohol y bebidas alcohólicas a escala industrial. Se ha desarrollado asimismo un proceso de escalado para la producción de alcohol empleando un sistema de bioreactores de lecho fijo (MFBT) de 12000 L (Koutinas y col., 2007).

**Polisacáridos.** Se ha sugerido el empleo de suero como sustrato para la obtención de kefiran. El kefiran es producido durante el crecimiento de los gránulos de kefir, parte del mismo queda retenido en la matriz de los gránulos constituyendo un 8-10% de la misma y otra parte es liberada al medio durante la fermentación del suero. La producción de este EPS a partir de la lactosa presente en el suero ha sido caracterizada a distintas temperaturas y empleando distintas concentraciones de gránulos de kefir, asimismo se han desarrollado distintos métodos para su obtención (Rimada y Abraham 2001; 2003). El uso de suero para la producción de kefiran es una alternativa interesante, ya que se ha demostrado que este EPS posee efectos benéficos sobre la salud, es capaz de formar geles cohesivos traslúcidos y películas comestibles transparentes que podrían emplearse como aditivo o recubrimiento de alimentos (Shiomi y col., 1982; Murofushi y col., 1983; Rodrigues y col., 2005; Vinderola y col., 2006a; Medrano y col. 2008, 2009, 2011; Piermaría y col., 2008; 2009; 2011).

**Bebidas fermentadas.** Athanasiadis y col. (2004) propusieron el desarrollo de una bebida a partir de suero fermentado con microorganismos de kefir inmovilizados en material celulósico o gluten. Asimismo Mazaheri Assadi y col. (2008) sugirieron el uso de suero como sustrato para obtener una bebida por fermentación con gránulos kefir o microorganismos aislados a partir de ellos.

**Agente leudante para panadería.** Se ha sugerido el uso de kefir crecido en suero en reemplazo de levadura para producir masa fermentada para pan a fin de mejorar el

sabor, la textura y contribuir a prolongar su vida útil mediante la producción *in situ* de compuestos antimicrobianos (Harta y col., 2004; Plessas y col., 2005; 2007).

**Starters para la producción de quesos.** Se han realizado numerosos estudios con el fin de desarrollar cultivos iniciadores para la obtención de distintos tipos de quesos (duro, feta y de suero) a partir de kefir empleando suero como sustrato (Kourkoutas y col., 2006; Dimitrellou y col., 2007; 2009; Katechaki y col., 2008; 2009). Estos estudios proponen la utilización de suero para aumentar la biomasa de microorganismos de kefir y luego obtener *starters* por secado térmico o liofilización. Se ha reportado que el empleo de estos cultivos starters aceleran la maduración (Koutinas y col., 2010), mejoran la calidad sensorial y el tiempo de conservación de los quesos (Katechaki y col., 2008; 2009; Dimitrellou y col., 2009; Koutinas y col., 2010).

**Proteína celular (en inglés: SCP).** Paraskevopopoulou y col. (2003) desarrollaron un sistema de producción de SCP a partir de suero fermentado con microorganismos de kefir. La biomasa obtenida presentó 53.9 % de proteínas con propiedades emulsificantes similares a proteínas de soja pero con mayor capacidad espumante y gelificante. Koutinas y col. (2005) llevaron a cabo estudio de escalado de este producto a escala semi-industrial.



## Objetivos

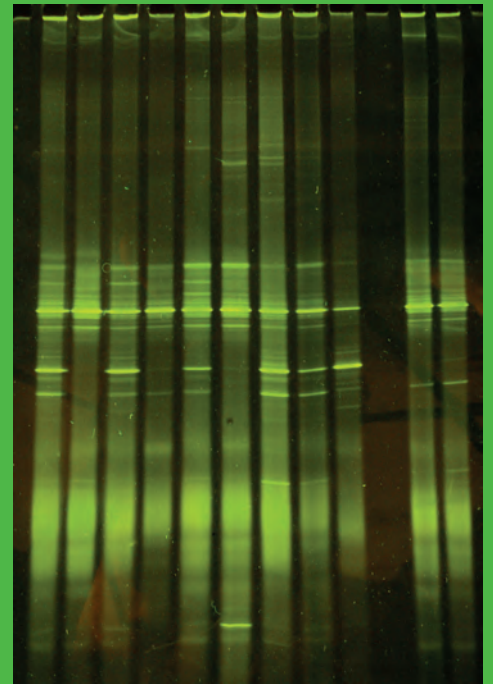
Considerando que gran parte del suero es aún desperdiciado se plantea la necesidad de buscar alternativas para su aprovechamiento, siendo particularmente interesantes aquellas que requieren baja inversión de manera de estar al alcance de pequeños y medianos productores. En base a esto se propone el estudio de la fermentación de suero con gránulos o microorganismos de kefir a fin de obtener, a bajo costo, un alimento funcional para aves que aumente el valor agregado del suero y aproveche sus propiedades nutricionales y las probióticas del kefir.

Se plantean como objetivos específicos de este trabajo de tesis:

- 1- Estudiar la capacidad de gránulos o microorganismos de kefir para fermentar suero de quesería y caracterizar los productos obtenidos desde el punto de vista químico y microbiológico.
- 2- Determinar el efecto inhibitorio del suero fermentado contra patógenos intestinales mediante ensayos *in vitro*.
- 3- Evaluar el antagonismo del suero fermentado sobre la adhesión e invasión de *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis en modelos *in vitro* e *in vivo* en pollos parrilleros.
- 4- Analizar la potencialidad del suero fermentado como aditivo para prevenir el riesgo de contaminación fúngica de alimento balanceado para pollos, así como para constituir un vehículo de inclusión de microorganismos de kefir viables con potencialidad probiótica a la dieta de estos animales.



# Capítulo 1: Caracterización de sueros fermentados con gránulos o microorganismos de kefir



## INTRODUCCIÓN

El kefir se elabora artesanalmente por el agregado de gránulos de kefir a leche previamente pasteurizada y enfriada a 20-25 °C. Luego de un período de fermentación de aproximadamente 24 horas, los gránulos son removidos por filtración y la bebida está lista para el consumo.

Una alternativa a la utilización de gránulos para la producción de kefir a gran escala consiste en realizar fermentaciones consecutivas. La primera se lleva a cabo como se describió anteriormente para obtener, luego de la remoción de los gránulos, un “cultivo madre” que se adiciona a la leche para una segunda fermentación (Simova y col., 2002). Otro método propuesto para la obtención de productos con propiedades organolépticas aceptables se basa en la preparación con un cultivo mixto de cepas aisladas de kefir (Beshkova y col., 2002; Kakisu y col., 2011).

El kefir puede elaborarse a partir de leche de cabra, oveja y vaca (Hayaloglu y col., 2011; Wójtowski y col., 2003). También se ha demostrado que los gránulos pueden utilizarse para la fermentación de otros sustratos, tales como leche de soja (Liu y Lin 2000; Kesenkaş y col., 2011; Pourahmad y col., 2011), soluciones azucaradas (Silva y col., 2009) y suero (Rimada y Abraham, 2001, 2003; Magalhães y col., 2010, 2011a, 2011b).

El suero de quesería es un sustrato interesante dado que presenta buenas propiedades nutricionales y funcionales. La alternativa de fermentar suero con gránulos de kefir ha sido explorada por varios autores tal como se describió en la introducción general, sin embargo, es escaso el conocimiento sobre la estabilidad de la microbiota de los gránulos en fermentaciones sucesivas en suero y la caracterización microbiológica de los productos obtenidos al emplear *starters* alternativos. Este estudio es fundamental para la utilización de microorganismos de kefir en la fermentación de suero en procesos industriales. Asimismo es interesante conocer en qué medida el suero fermentado presenta una composición microbiológica semejante al kefir obtenido en leche, dado que la presencia de bacterias ácido lácticas y levaduras probióticas determina las propiedades beneficiosas para la salud que se han asociado a su consumo.

## OBJETIVOS

Estudiar la capacidad de gránulos o microorganismos de kefir para fermentar suero de quesería y caracterizar los productos obtenidos desde el punto de vista químico y microbiológico.

### Objetivos particulares

- Evaluar si los gránulos de kefir se conservan como *starters* al ser utilizados en sucesivas fermentaciones de suero.
- Analizar comparativamente los productos obtenidos de la fermentación en leche y suero con gránulos de kefir.
- Caracterizar los productos obtenidos al variar el porcentaje de gránulos de kefir inoculados, el tipo de suero y la temperatura de incubación.
- Analizar el empleo de *starters* alternativos a los gránulos de kefir para fermentar suero y caracterizar los productos obtenidos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Sueros de quesería y medios de cultivo

Se emplearon leche descremada comercial (Sancor S.A, Argentina) y tres tipos de sueros: suero bovino en polvo donado por la empresa Lactogal S.A. (Portugal) reconstituido en agua destilada (10 % p/v) y sueros líquidos de origen bovino y ovino provistos por Lacticínios Lda (Portugal). Los medios de cultivo: Agua Peptonada Tamponada (APT) y Caldo Nutritivo fueron provistos por Biokar Diagnostics (Beauvais, France), el medio Yeast Extract-glucose-chloramphenicol (YGC) agar por Merck (D-64271 Darmstadt, Germany) y el medio De Man Rogosa & Sharpe (MRS) agar por Difco (Detroit, USA). Todos los medios de cultivo, se esterilizaron en autoclave a 120 °C, durante 15 min. La composición de estos medios de cultivo y de otros formulados utilizados durante este estudio se detalla en el Apéndice.

### 2. Obtención de leche y suero fermentados con gránulos de kefir

Se utilizaron gránulos CIDCA AGK10 de la colección del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Los mismos se adicionaron a suero o leche en concentración 1 % o 10 % p/v y se incubaron a 20 °C, 30 °C o 37 °C durante 24 h. Luego de la fermentación los gránulos se separaron del producto fermentado por filtración con un colador plástico, se lavaron con agua destilada y se volvieron a colocar en suero o leche para realizar una nueva fermentación.

### 3. Obtención de suero fermentado empleando otros cultivos iniciadores (*starters*)

#### 3.1. Empleo de cultivos madre como *starters*

##### 3.1.1 Cultivo madre en suero

Preparación de cultivo madre en suero: los gránulos de kefir se sembraron al 10 % p/v en suero y se incubó durante 24 h a 20 °C. El producto obtenido se denominó cultivo madre en suero.

Preparación de suero fermentado con cultivo madre en suero: el cultivo madre en suero se adicionó a suero fresco en una concentración 10 % v/v y se incubó a 20 °C durante 24 h.

### 3.1.2 Cultivo madre en leche

Preparación de cultivo madre en leche: Los gránulos de kefir se sembraron al 10 % p/v en leche y se incubó durante 24 h a 20 °C. El producto obtenido se denominó cultivo madre en leche.

Preparación de suero fermentado con cultivo madre en leche: el cultivo madre en leche se adicionó a suero fresco en una concentración 10 % v/v y se incubó a 20 °C durante 24 h.

### 3.2 Empleo de cepas aisladas de kefir como *starters*

Preparación de suspensiones de cepas aisladas de kefir: se utilizaron las cepas *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327, *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 y *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154. Los lactobacilos se cultivaron en caldo MRS y la levadura en caldo yeast peptone dextrose (ver Apéndice) durante 24 h a 30 °C. Los cultivos se centrifugaron a 10000 x g durante 15 min, se descartaron los sobrenadantes y los pellet se resuspendieron en PBS. Esta operación se repitió 2 veces a fin de eliminar por completo el medio de cultivo. Las suspensiones de microorganismos en PBS fueron utilizadas como *starters*. La concentración de microorganismos viables de las suspensiones se calculó indirectamente midiendo la densidad óptica a 600 nm. Para esto previamente se construyeron curvas de calibración DO<sub>600nm</sub> en función de la concentración de microorganismos viables.

Preparación de suero fermentado con cepas aisladas de kefir: el suero es esterilizó por tindalización colocándose 3 veces a vapor fluente (100 °C) durante 30 min con un intervalo de 24 h entre cada vez. Las suspensiones de cepas aisladas de kefir se inocularon individualmente o las 3 en forma conjunta en 100 ml de suero en cantidad necesaria para obtener una concentración final de cada cepa de  $1 \times 10^6$  UFC/ml de suero. Inmediatamente luego de la inoculación se realizaron recuentos de microorganismos viables en MRS-agar para bacterias ácido lácticas y en YGC-agar para levaduras a fin de verificar que el inóculo haya sido el requerido para cada experimento. Luego el suero inoculado se incubó durante 72 h a 30 °C.

#### 4. Aumento de biomasa de gránulos de kefir.

Luego de cada fermentación los gránulos fueron removidos del medio por filtración, lavados con agua destilada y secados sobre un papel absorbente hasta peso constante. Luego fueron pesados en una balanza analítica Precisa 205A (precisión  $\pm 0.1$  mg). El aumento de biomasa de los gránulos fue expresado como:

$$\text{Aumento de biomasa} = (\text{peso inicial} - \text{peso final}) / \text{peso inicial}$$

#### 5. Análisis de la composición química de los gránulos de kefir y productos fermentados

##### 5.1. Determinación de humedad

El contenido de humedad de los gránulos de kefir y productos fermentados fue determinado por secado a  $103 \pm 2$  °C hasta peso constante de acuerdo a la Norma Portuguesa (NP) 875 (1994).

##### 5.2. Determinación de cenizas

La muestra se calentó suavemente en la llama para vaporizar el agua y materiales volátiles. Se llevó a masa carbonosa en triángulo de pipas. Luego se incineró en una mufla a 550 °C hasta cenizas blancas y se determinó el porcentaje de cenizas (Artículo 13.12, Metodología Analítica Oficial, Código Alimentario Argentino).

##### 5.3. Análisis de minerales

La muestra fue incinerada a 550 °C según lo descrito en la sección 5.2. Para la determinación de sodio, magnesio y potasio la misma fue luego digerida con ácido clorhídrico diluido, filtrada y diluida hasta el volumen adecuado de acuerdo al elemento a cuantificar. Luego se analizó en un espectrofotómetro de absorción atómica con llama de aire acetileno. La absorbancia de la muestra fue comparada con una curva patrón del elemento a fin de efectuar su cuantificación (Norma ISO 6869, 2009).

La cuantificación del fósforo se realizó de acuerdo a la Norma Portuguesa 874 (2000). La muestra incinerada fue digerida con ácido clorhídrico diluido y ácido nítrico, se filtró y



diluyó a concentración adecuada para su medición. La solución ácida conteniendo ortofosfato se trató con un reactivo de Vanadato-Molibdato formándose un complejo estable de color amarillo (ácido vanadimolibdofosfórico), su absorbancia se leyó a 430 nm. Los valores fueron luego comparados con una curva patrón de concentraciones conocidas de fósforo.

#### **5.4. Determinación de azúcares**

La cantidad de azúcares totales presentes en las muestras fue determinada mediante el Método de Antrona. Para la determinación, en primer lugar se hidrolizó una masa de gránulo en una mezcla de agua destilada y ácido clorhídrico 9:1. A continuación se colocaron en tubos de vidrio con tapa 200 µl de las soluciones a ensayar y 2 ml de reactivo de Antrona (ver Apéndice), se agitó por inversión y se llevó a baño de agua a ebullición durante 15 minutos. Luego se enfrió a temperatura ambiente y se dejó en oscuridad durante 30 minutos. Finalmente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm en un espectrofotómetro Henos Alpha & Beta (Thermo Spectronic, UK). En forma simultánea se realizó una curva de calibración, usando soluciones de glucosa de concentración conocida en un rango entre 0 y 400 µg/ml. El método se realizó de acuerdo a Southgate (1991).

#### **5.5. Determinación del contenido de lactosa**

La lactosa se cuantificó por cromatografía líquida de alta presión según el método descrito por Chavez-Servín y col. (2004). La separación se efectuó en una columna C<sub>18</sub> 5-µm (150 x 4.0-mm), a una tasa de flujo de 1.0 ml/min con 1 % v/v de ácido acético:acetonitrilo 95:5 como fase móvil. La detección fue realizada con un detector a 273 nm.

#### **5.6. Determinación del contenido de proteínas totales**

El contenido de proteínas totales en los productos fermentados se determinó por el método de Kjeldal según la norma ISO 5983-2 (2009).

La determinación de proteínas en gránulos de kefir se realizó mediante el método del ácido bisinconínico (BCA). Para ello se pesaron 0.5 g de gránulos en una balanza analítica (Precisa Instrument Ltd., Switzerland), se adicionó 1 ml de buffer fosfato pH 7 con urea 3 M y se calentó a baño María durante 45 min. Luego se analizaron las muestras mediante el kit comercial BCA de Pierce (Rockford, Illinois, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. La curva de calibración se realizó con albumina disuelta en el mismo buffer utilizado para disolver los gránulos.

### **5.7. Determinación de lípidos**

Los lípidos se determinaron de acuerdo al método de Rose-Gottlieb. El suero o el suero fermentado fueron tratados con amoníaco y alcohol para desagregar las proteínas y luego la grasa liberada fue extraída con éter dietílico y éter de petróleo (Artículo 13.8 B, Metodología Analítica Oficial, Código Alimentario Argentino).

## **6. Cinéticas de acidificación y producción de ácidos orgánicos**

Durante la fermentación se tomaron muestras a intervalos regulares para determinar el pH y producción de ácidos orgánicos. El pH se midió mediante un peachímetro modelo pH211 asociado a un microelectrodo HI 1131B (Hanna Instrument, USA). Los ácidos orgánicos se determinaron cualitativa y cuantitativamente mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Para la preparación de la muestra 1 ml de producto fermentado se centrifugó durante 10 min a 14000 x g. El sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore Corporation, Milford, MA 01757, USA) y 10  $\mu\text{l}$  del filtrado se inyectaron en el cromatógrafo. Los ácidos se separaron en una columna de intercambio iónico AMINEX HPX-87H (BioRad Labs, Richmond, CA 94804, USA) y se detectaron a 214 nm (Waters™ 996, Millipore Corporation, Milford, MA 01757, USA). La determinación se llevó a cabo a una velocidad de flujo de 0.7 ml/min a 60 °C y utilizando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.009 N como fase móvil. La identificación de los ácidos se basó en la comparación de los tiempos de retención con soluciones estándar de ácidos (Tabla 1.1). El tiempo de retención de los ácidos se obtuvo a partir de un cromatograma realizado con una solución acuosa de los estándares

preparados con reactivos de grado HPLC (Sigma Chemical Co), obtenidos en la puesta a punto del método.

**Tabla 1.1:** Tiempo de retención de soluciones estándar de ácidos orgánicos

	Tiempo (min)
Ácido oxálico	8.2
Ácido cítrico	9.2
Ácido ascórbico	10.1
Ácido pirúvico	10.6
Ácido málico	10.8
Ácido succínico	13.0
Ácido láctico	14.4
Ácido fórmico	15.7
Ácido acético	17.0
Acido propiónico	20.0
Acido butírico	24.1

Se realizaron curvas de calibración con ácido láctico, ácido acético y ácido cítrico mediante las cuales se calcularon las concentraciones de los mismos en las muestras.

## 7. Enumeración de microorganismos viables

Para determinar la concentración de microorganismos viables en gránulos de kefir y productos fermentados se llevaron a cabo diluciones apropiadas en triptona 0.1 % y se realizó un recuento de microorganismos viables en placa empleándose MRS agar para bacterias ácido lácticas (BAL) e YGC agar para levaduras. Los gránulos de kefir fueron previamente disgregados en un mortero estéril. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonia (UFC)/ml para los productos fermentados y UFC/g para los gránulos de kefir.

## 8. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para el análisis de gránulos de kefir crecidos en leche y suero por MEB se cortaron porciones de 1 a 2 mm de gránulos frescos. Los mismos fueron fijados durante 20 h con glutaraldehído

(Riedel de Haen, Seelze, Germany) al 2 % v/v en buffer fosfato pH 7. Luego se llevó a cabo la deshidratación en soluciones crecientes de etanol (20, 50, 70, 90 y 100 %) en PBS, colocándose las muestras 1 h en cada concentración. Las muestras fueron montadas en tacos metálicos y cubiertas con Au 24 durante 10 min por evaporación en vacío (Fine Coat, Sputer JFC 1100). La observación se realizó en un microscopio electrónico de barrido Philips SEM 505 que cuenta con un programa para la obtención de imágenes digitales (Digitalizador de Imagen Soft Imaging System ADDA II (SIS).

## **9. Extracción de ADN**

### **9.1 Extracción de ADN de gránulos de kefir**

Se evaluaron 4 procedimientos de disrupción de los gránulos de kefir que se describen a continuación:

- 1.** Los gránulos se escurrieron durante 20 min en papel secante. Luego, se colocó 1 g de gránulos con 20 ml de agua esterilizada por filtración en un baño de agua hirviendo durante 20 min, con el fin de disolver el polisacárido presente en la matriz de los gránulos. Se centrifugó 15 min a 15000 x g en una centrífuga Sorvall RC-5B plus (Sorvall Products, L.P. Newtown, CT, USA). Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 10 ml de agua, se calentó y centrifugó como se describió anteriormente. El pellet se resuspendió en 1 ml de agua.
- 2.** Se repitió el procedimiento 1. Luego la muestra resuspendida en 1 ml de agua fue tratada por shock térmico, colocándose 3 veces alternativamente durante 30 s en nitrógeno líquido y 30 s en agua a 80 °C.
- 3.** Los gránulos se escurrieron durante 20 min en papel secante. Luego, 1 g de gránulos de fue congelado en nitrógeno líquido, triturado en un mortero y resuspendido en 1 ml de agua a temperatura ambiente. Luego se repitió el mismo procedimiento de congelación y trituración.
- 4.** Se repitió el procedimiento 3. Luego la muestra se resuspendió en 10 ml de agua a 80 °C. Se centrifugó por 15 min a 15000 x g y el pellet se resuspendió en 1 ml de agua.

Luego todas las muestras se centrifugaron por 15 min a 15000 x g y el ADN fue extraído y purificado directamente mediante el uso del kit AccuPrep Genomic DNA Extraction (BIONEER, Korea) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante para tejidos o tratado previamente con enzimas líticas.

Para el tratamiento enzimático las muestras fueron resuspendidas en 10 µl de buffer liticasa (ver Apéndice), se añadieron 10 µl de liticasa 2.5 mg/ml (Sigma Chemical, St. Louis, USA) y la mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C. Luego se agregaron 40 µl de buffer TES (ver Apéndice) y 10 mg/ml de lisozima (Sigma Chemical, St. Louis, USA) y se incubó durante 15 min a 20 °C. Se seleccionó una metodología de acuerdo a la calidad de los perfiles obtenidos por electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) y a la cantidad y pureza del ADN obtenido medida por espectrofotometría.

## 9.2 Extracción de ADN de productos fermentados

Para la extracción de ADN 1.5 ml de producto fermentado fueron centrifugados a 10000 x g por 15 min. El pellet se utilizó directamente (procedimiento 1) o bien fue tratado previamente por shock térmico, resuspendiéndose en agua y colocándose 5 veces alternativamente durante 30 s en nitrógeno líquido y 30 s en agua a 80 °C (procedimiento 2). Para la extracción y purificación de ADN las muestras resultantes se trataron empleando el kit AccuPrep Genomic de BIONEER de acuerdo al protocolo para células (protocolo A) o para tejidos directamente (protocolo C) o con tratamiento enzimático previo (protocolo B). El tratamiento enzimático se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección 9.1. Las variables antes mencionadas fueron ensayadas para leche fermentada con gránulos de kefir. Se seleccionó una metodología de acuerdo a la calidad de los perfiles DGGE.

## 9.3 Extracción de ADN de cepas de referencia

Para la extracción de ADN de todas las cepas se empleó el kit AccuPrep Genomic DNA Extraction (BIONEER, Korea) de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante para la extracción de ADN de células. Se emplearon las cepas comerciales: *Lactobacillus plantarum* DSMZ 20174, *Lactobacillus parakefir* DSMZ1055, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp.

*kefiranofaciens* DSMZ 5016 y JCM 6985, *Lactobacillus acidophilus* DSM Z20079, *Lactobacillus casei* DSMZ 20011, *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 y JCM 1059, *Lactobacillus kefir* ATCC8007 y JCM 5818 y *Kluyveromyces lactis*. Las cepas ATCC fueron adquiridas de American Type Culture collection (Manassas, VA 20108, USA), las cepas DSMZ a partir de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen (Alemania), las cepas JCM de Japanese Collection of Microorganisms (Japón) y las NZ de New Zealand Dairy Research Institute Culture Collection (Nueva Zelanda).

Además se utilizaron cepas aisladas previamente a partir de gránulos de kefir y pertenecientes a la colección de CIDCA: *L. plantarum* CIDCA 83114 y 337, *L. parakefir* CIDCA 8328, *L. kefir* CIDCA 8348 y CIDCA 8321, *Acetobacter* sp. CIDCA 8431, *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154, *Saccharomyces unisporus* CIDCA 81107 y *Saccharomyces cerevisiae* CIDCA 8112.

#### 10. Amplificación mediante reacción de polimerización en cadena (PCR)

El ADN de la comunidad bacteriana fue analizada empleando los *primers* universales GC-338f y 518r que amplifican la región V3 del gen del ARNr 16S (Muyzer y col., 1993) y la de levaduras utilizando los *primers* GC-NL1 y LS2 que se amplifican la región D1 del gen del ARNr 26S (Cocolin y col., 2000) (Tabla 1.2).

**Tabla 1.2:** *Primers* empleados para la amplificación de ADN de la comunidad de bacterias y levaduras de gránulos de kefir y productos fermentados.

<i>Primer</i>	Secuencia 5' → 3'
GC-338f	5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG -3'
518	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG -3'
GC-NL1	5'- GCG GGC CGC GCG ACC GCC GGG ACG CGC GAG CCG GCGGCG GGC CAT ATC AAT AAG CGG AGG AAA AG -3'
LS2	5'- ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC -3'

Las reacciones PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 20 µl conteniendo 0.5 µM de cada *primer*, 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Inbio Highway, Tandil, Argentina), 2 µl del buffer

provisto con la enzima (100 mM TRIS-HCl, 500 mM KCl, pH 9), 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP y 3 µl de ADN. Las reacciones PCR fueron llevadas a cabo en el ciclador MyCycler Thermal (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Los programas de amplificación para Eubacterias se detallan en la Tabla 1.3 y para levaduras en la Tabla 1.4.

**Tabla 1.3:** Programa de amplificación para Eubacterias utilizando los *primers* GC-338f y 518.

Temperatura (°C)	Tiempo	N° de ciclos	Descripción
94	5 min	1	Desnaturalización inicial
94	30 s	35	Desnaturalización
60	60 s		Annealing
72	30 s		Extensión
72	5 min	1	Extensión final

**Tabla 1.4:** Programa de amplificación para levaduras utilizando los *primers* GC-NL1 y LS2.

Temperatura (°C)	Tiempo	N° de ciclos	Descripción
95	5 min	1	Desnaturalización inicial
95	60 s	30	Desnaturalización
60	45 s		Annealing
72	60 s		Extensión
72	7 min	1	Extensión final

Alícuotas de los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa (10 g/L) conteniendo bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz UV.

### 11. Análisis por electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

Los productos PCR fueron analizados por DGGE utilizando un equipo DGGE-2401 (C.B.S. Scientific Co., Del Mar, CA, USA) con geles de 15 x 20 x 0.075 cm. Las muestras se sembraron en geles de poliacrilamida 8 % p/v en buffer TAE. La separación óptima se alcanzó empleando gradientes desnaturizantes urea-formamida 40-60 % para productos de amplificación empleando *primers* para Eubacterias y 30-70 % para productos de amplificación empleando *primers* para levaduras (100 % corresponde a 7 M de urea y 40 %

v/v de formamida). La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante 100 V durante 16 h a 60 °C. Los geles se tiñeron y visualizaron bajo luz U.V. La tinción se realizó con bromuro de etidio cuando se analizaron perfiles DGGE de cepas aisladas y con Syber Gold (Invitrogen, Oregon, USA) cuando se estudió la comunidad microbiana de gránulos de kefir y productos fermentados. El colorante SYBR Gold (Invitrogen, Oregon, USA) es 10 veces más sensible que el bromuro de etidio. Este es un colorante fluorescente de cianina asimétrica que forma un complejo con ADN o ARN de simple o doble cadena aumentando 1000 veces su fluorescencia.

Los reactivos utilizados, el método de preparación de los geles y de tinción se detallan en el Apéndice.

## 12. Identificación de bandas DGGE

Las bandas de los geles de poliacrilamida se identificaron por comparación de su posición con las de bacterias ácido lácticas y levaduras de identidad conocida. Además se llevó a cabo un análisis de secuenciación. Las bandas fueron extraídas con un bisturí, eluidas en buffer TE y almacenadas durante 16 h a 4 °C para permitir la difusión del ADN. Luego se reamplificaron con los *primers* originales sin la cola GC utilizando el protocolo descrito en la sección 10.

Los productos de la amplificación fueron purificados mediante el kit comercial (GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit, GE Healthcare, UK) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Las muestras de ADN obtenidas se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 1 %. Las bandas resultantes fueron comparadas de con las de un marcador de tamaño molecular 100-1000 pb para ADN con concentración conocida (Inbio-Highway, Argentina) verificándose que presenten el tamaño esperado y estimándose la concentración de ADN.

Posteriormente se prepararon células competentes de *Escherichia coli* utilizando un método químico. Un mililitro de un cultivo de *E. coli* de 16 h se sembró en 100 ml de medio LB y se cultivó a 37 °C en agitación (225 rpm) hasta  $DO_{600nm} = 0.45-0.55$ . Luego se colocó en hielo por 15 min. Se centrifugó (3000 rpm, 4 °C, 8 min), se descartó el sobrenadante



cuidadosamente y el pellet fue resuspendido en 5 ml de medio LB más 5 ml de TSS-2X (ver Apéndice). La solución resultante se incubó en baño de hielo por 20 min, se fraccionó en eppendorf estériles y se congeló con N<sub>2</sub> líquido. Las células competentes fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

Para el clonado se utilizó el kit pGEM-T y pGEM-T Easy Vector Systems (Promega Co., USA). La inserción del plásmido y el clonado se llevó a cabo según las instrucciones del proveedor. Se seleccionaron 5 colonias recombinantes por cada muestra y se enviaron a MacroGen (Seul, Korea) para su secuenciación en el equipo 3730XLs 23 ABI DNA sequencer. Las secuencias fueron comparadas con las de la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) usando el programa BLAST.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Fermentación suero con gránulos de kefir

Los gránulos de kefir se cultivan tradicionalmente en leche a temperatura ambiente. Por lo tanto en una primera instancia se analizó si los mismos se conservaban como *starters* al ser utilizados en sucesivas fermentaciones de suero.

Los gránulos de kefir se cultivaron en leche y suero durante 20 subcultivos a 20 °C y se analizó comparativamente su crecimiento, aspecto, composición química y composición microbiológica en ambos sustratos. Se analizó luego el pH, el contenido de ácidos orgánicos, la concentración de lactosa y la composición microbiológica de la leche y el suero fermentados empleando gránulos de kefir crecidos en los correspondientes sustratos.

#### 1.1 Similitud de gránulos de kefir crecidos en leche y suero

Cuando los gránulos de kefir son cultivados en leche incrementan su peso como consecuencia del crecimiento de los microorganismos y el aumento de la matriz de polisacárido y proteína que los rodea. En el presente estudio se determinó que la tasa de crecimiento de los gránulos de kefir, definida como aumento de peso por gramo de gránulo por subcultivo, no fue significativamente diferente ( $P > 0.05$ ) en leche y suero con valores de  $0.085 \pm 0.040$  g/g y  $0.076 \pm 0.040$  g/g respectivamente. Asimismo no se observaron diferencias en la apariencia de los gránulos luego de 20 subcultivos sucesivos en suero (Figura 1.1). Estos resultados fueron alentadores ya que el aspecto de los gránulos nos da información acerca de su estado fisiológico y el aumento de peso indica que la microbiota presente en los gránulos está activa y el balance de microorganismos es adecuado siendo esto necesario para la síntesis de los componentes de la matriz que los inmovilizan (Garrote y col., 2010a).



**Figura 1.1:** Apariencia de gránulos de kefir AGK-10 luego de 20 subcultivos a 20 °C en leche (izquierda) y en suero (derecha).

La composición microbiológica y química (Tabla 1.5) de los gránulos subcultivados en ambos sustratos tampoco fue significativamente diferente ( $P > 0.05$ ) confirmando la observación macroscópica sobre el estado general de los gránulos.

**Tabla 1.5:** Composición microbiológica y química de gránulos de kefir crecidos en leche y suero.

	BAL <sup>1</sup> (UFC/g)	Levaduras (UFC/g)	Humedad (g/kg)	Proteínas (g/kg)	Polisacáridos (g/kg)
Leche	$6.7 \pm 2.7 \times 10^7$ <sup>a2</sup>	$3.5 \pm 0.8 \times 10^{7a}$	$838 \pm 10^a$	$49 \pm 8^a$	$87 \pm 15^a$
Suero	$6.0 \pm 3.1 \times 10^7$ <sup>a</sup>	$8.2 \pm 3.0 \times 10^{7a}$	$805 \pm 5^a$	$52 \pm 4^a$	$87 \pm 7^a$

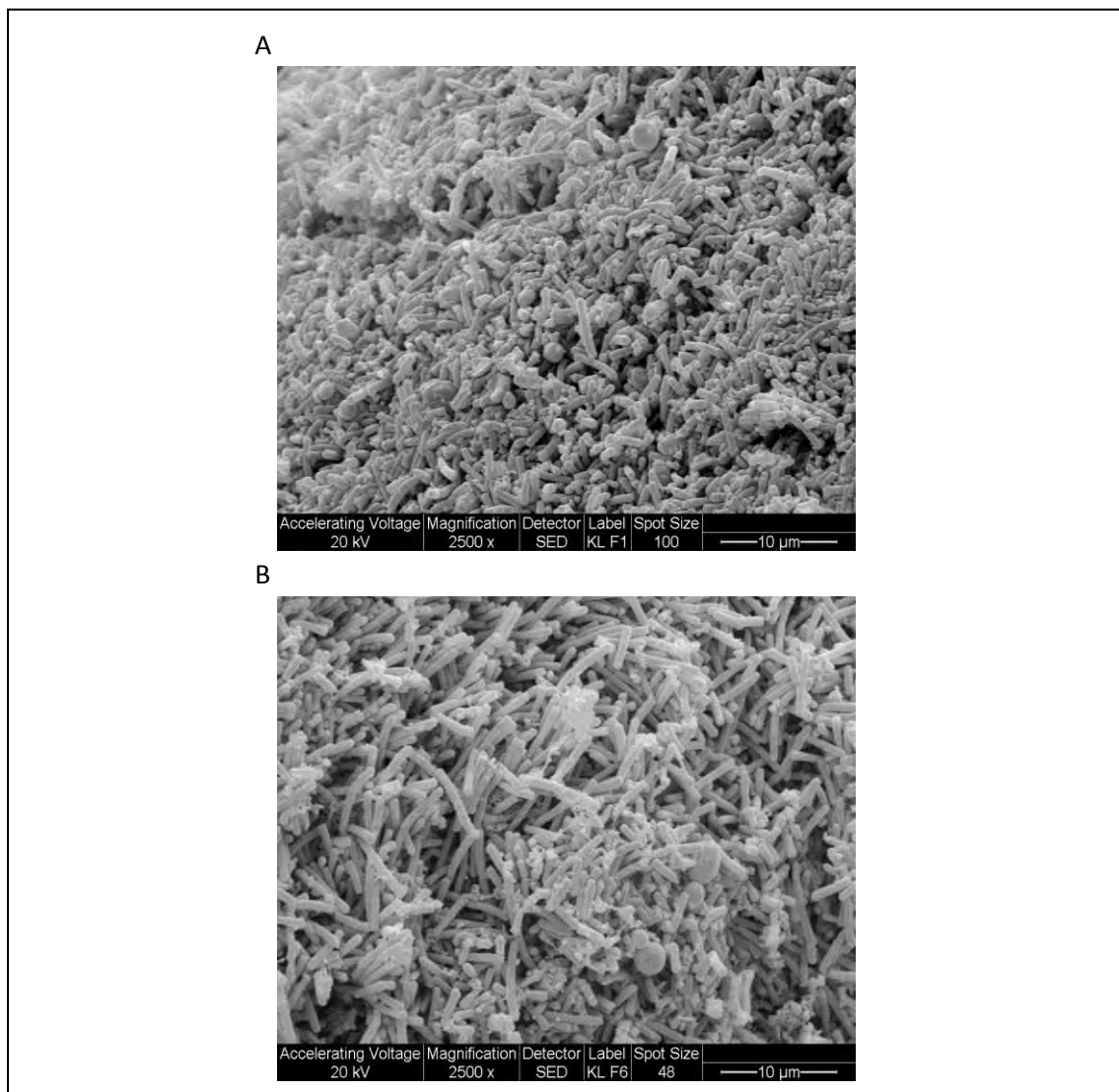
<sup>1</sup> BAL: bacterias ácido lácticas

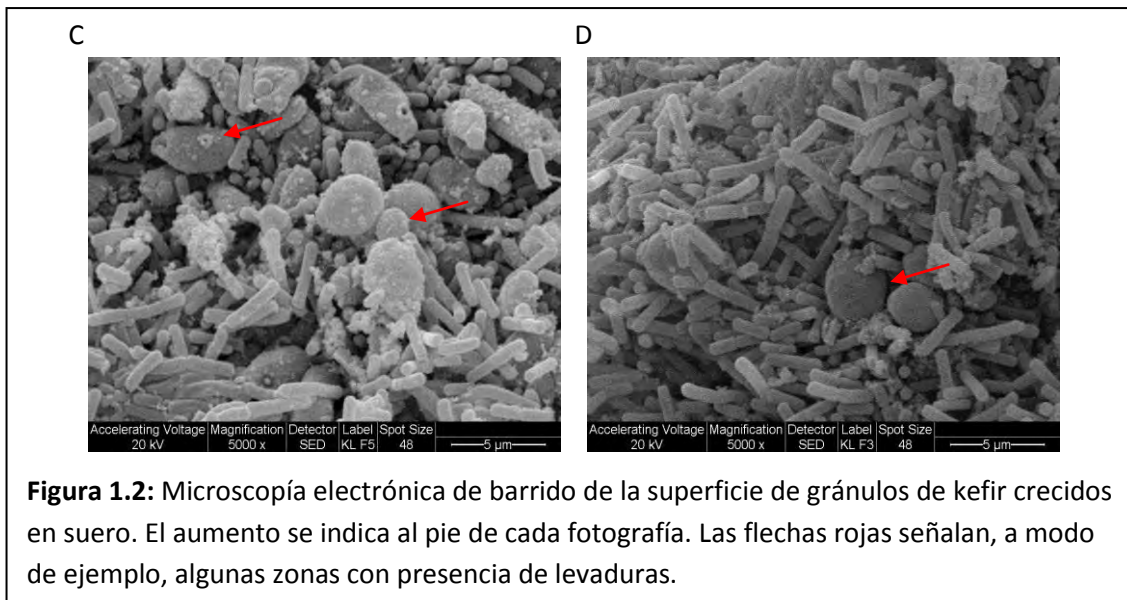
<sup>2</sup> Dentro de la misma columna letras iguales indican que no existen diferencias significativas ( $\alpha 0.05$ ) evaluadas mediante test T de student.

La composición de los gránulos hallada en este trabajo es similar a la de descrita previamente por otros autores para gránulos de kefir crecidos en leche (Garrote y col., 1997; Abraham y De Antoni, 1999). Así mismo los valores se corresponden con aquellos descritos por Rimada y Abraham (2001) para gránulos de kefir CIDCA AGK1 crecidos en suero desproteinizado. Estos autores hallaron una concentración de  $1.8 \pm 1.4 \times 10^8$  UFC/g

de BAL y de  $2.1 \pm 1.7 \times 10^7$  UFC/g de levaduras, un contenido de proteínas de  $50 \pm 6$  g/kg, de polisacáridos de  $82 \pm 16$  g/kg y una de humedad de  $807 \pm 13$  g/kg.

La distribución de los microorganismos en la superficie de los gránulos de kefir crecidos en suero se estudió por microscopía electrónica de barrido (Figura 1.2). Se observó la presencia de una abundante cantidad de microorganismos, predominando las bacterias con forma de bacilos de distinta longitud y tamaño, algunas libres y otras en cadenas. Esto se evidencia claramente en las fotografías de menor aumento (Figura 1.2 A y B). No pudo detectarse la presencia de cocos. Como se señala con flechas en rojo en la Figura 1.2 C y D, las levaduras se encontraron dispersas entre los bacilos en algunas zonas en mayor abundancia que en otras.





Las fotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido en el presente trabajo fueron notablemente similares con aquellas obtenidas por Zhou y col. (2009) de la superficie externa de gránulos de kefir tibetanos crecidos en leche. Estos autores describieron que la porción externa de gránulos contenía una alta densidad de lactobacilos cortos y levaduras, mientras que en la interna observaron material fibrilar, levaduras y bacilos de mayor longitud rectos y curvados. Estos autores tampoco observaron cocos en la superficie externa de los gránulos, a pesar de que hallaron la presencia de *Lactococcus lactis* en los mismos por métodos independientes de cultivo. Atribuyen esta observación a una baja capacidad de adhesión de los lactococos a la superficie de los gránulos.

En correspondencia con lo hallado en el presente trabajo, Magalhães y col. (2010) no detectaron diferencias en la estructura externa ni interna de gránulos de kefir crecidos en leche y suero analizados mediante microscopia confocal empleando sondas moleculares específicas para ácidos nucleicos, paredes celulares de levaduras y polisacáridos. Estos autores describen que las levaduras se agrupan en pequeñas regiones distribuidas al azar entre las bacterias y el polisacárido. En las observaciones al microscopio de barrido realizadas en el presente estudio no se observaron agrupamientos entre levaduras.

A fin de profundizar el estudio sobre la composición microbiana de los gránulos de kefir crecidos en suero y leche se empleó electroforesis en gel con gradiente desnaturizante

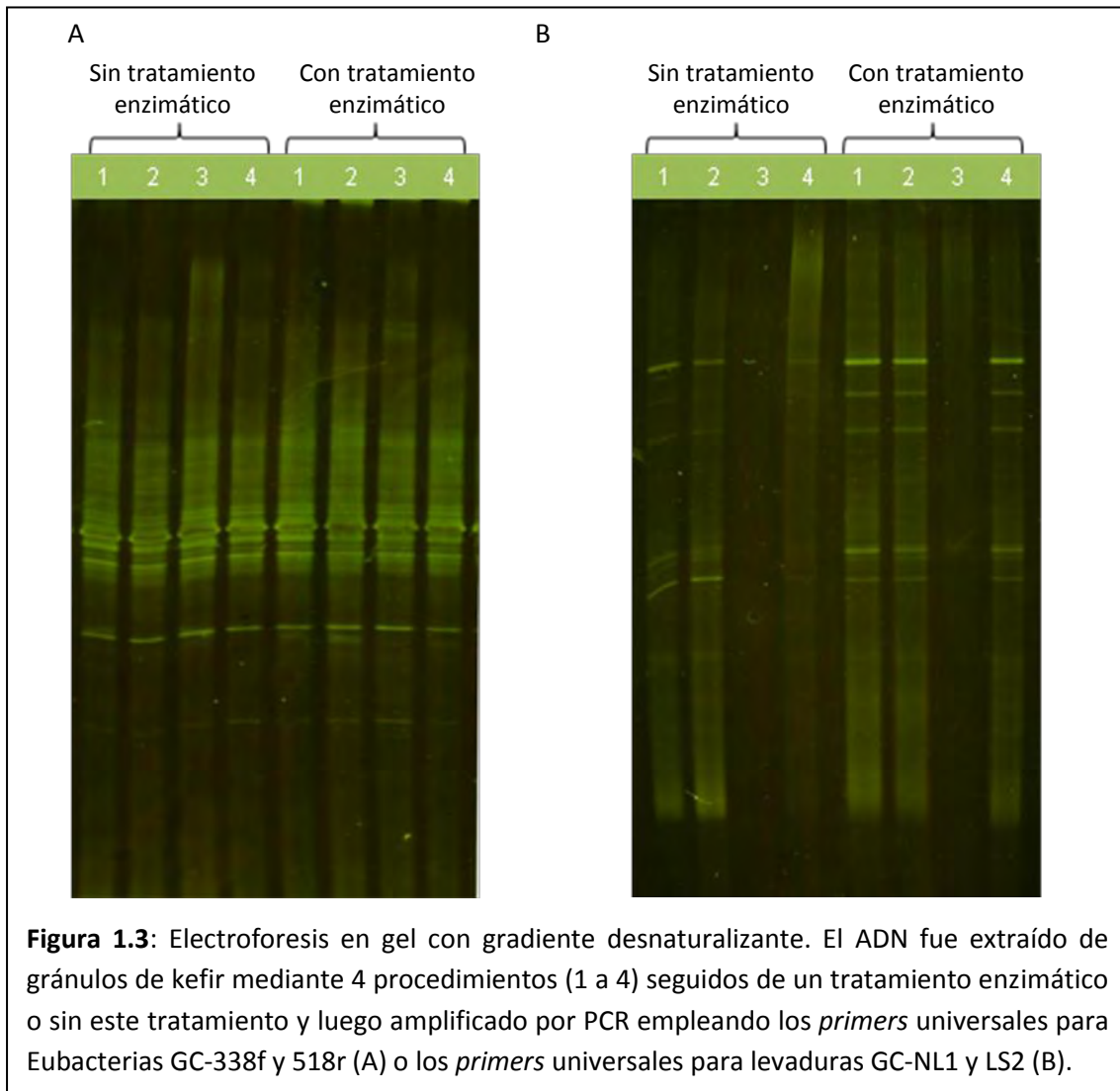
(DGGE). Esta es una de las técnicas moleculares más extensamente utilizada para el estudio de comunidades microbianas complejas (Muyzer, 1999). Garbers y col. (2004) demostraron que el DGGE es un método exitoso para tipificar el consorcio microbiano presente en los gránulos de kefir, así como para distinguir entre gránulos de diferente origen y cultivados en distintas condiciones. Además ha sido descrito que mediante DGGE es posible detectar bacterias ácido lácticas presentes en kefir que no se recuperan mediante técnicas dependientes de cultivo (Chen y col., 2008).

En una primera etapa fue necesario optimizar la extracción de ADN a partir de gránulos de kefir. Se emplearon 4 procedimientos para disgregar los gránulos con el fin de seleccionar el más adecuado para separar los microorganismos de los componentes de la matriz (ver materiales y métodos, sección 9.1). Se extrajo luego ADN con y sin tratamiento previo con enzimas líticas. El ADN obtenido fue amplificado y analizado mediante DGGE.

Para el estudio de la comunidad bacteriana se amplificó por PCR la región V3 del ADNr 16S empleando los *primers* universales GC-338f y 518r. Los productos PCR fueron luego analizados por DGGE empleando un gradiente urea-formamida 40-60 %. La comunidad de levaduras se analizó mediante los *primers* universales GC-NL1 y LS2 que amplifican la región D1 del ADNr 26S y se empleó un gradiente urea-formamida 30-70 %.

Los perfiles DGGE obtenidos al amplificar el ADN obtenido mediante los diferentes procedimientos de extracción con *primers* para Eubacterias fueron iguales (Figura 1.3 A), pero empleando *primers* para levaduras sólo los procedimientos en los que los gránulos fueron disgregados en agua caliente (1, 2 y 4) y tratados enzimáticamente resultaron exitosos (Figura 1.3 B). El agua caliente disuelve el polisacárido presente en la matriz de los gránulos permitiendo la liberación de los microorganismos contenidos en la misma, mientras que la liticasa degrada la pared celular de las levaduras mejorando la extracción de ADN. El aumento de la eficiencia de extracción de ADN de levaduras al tratar las muestras con liticasa previamente al uso de un kit comercial ha sido descrita por otros autores (Kirchmayr y col., 2011). Los tres procedimientos para los que se obtuvieron perfiles con mayor número de bandas, presentaron buena cantidad y pureza de ADN con una relación de absorbancia 260/280 mayor a 1.8 y una concentración mayor a 70 ng/ $\mu$ l. Debido a su

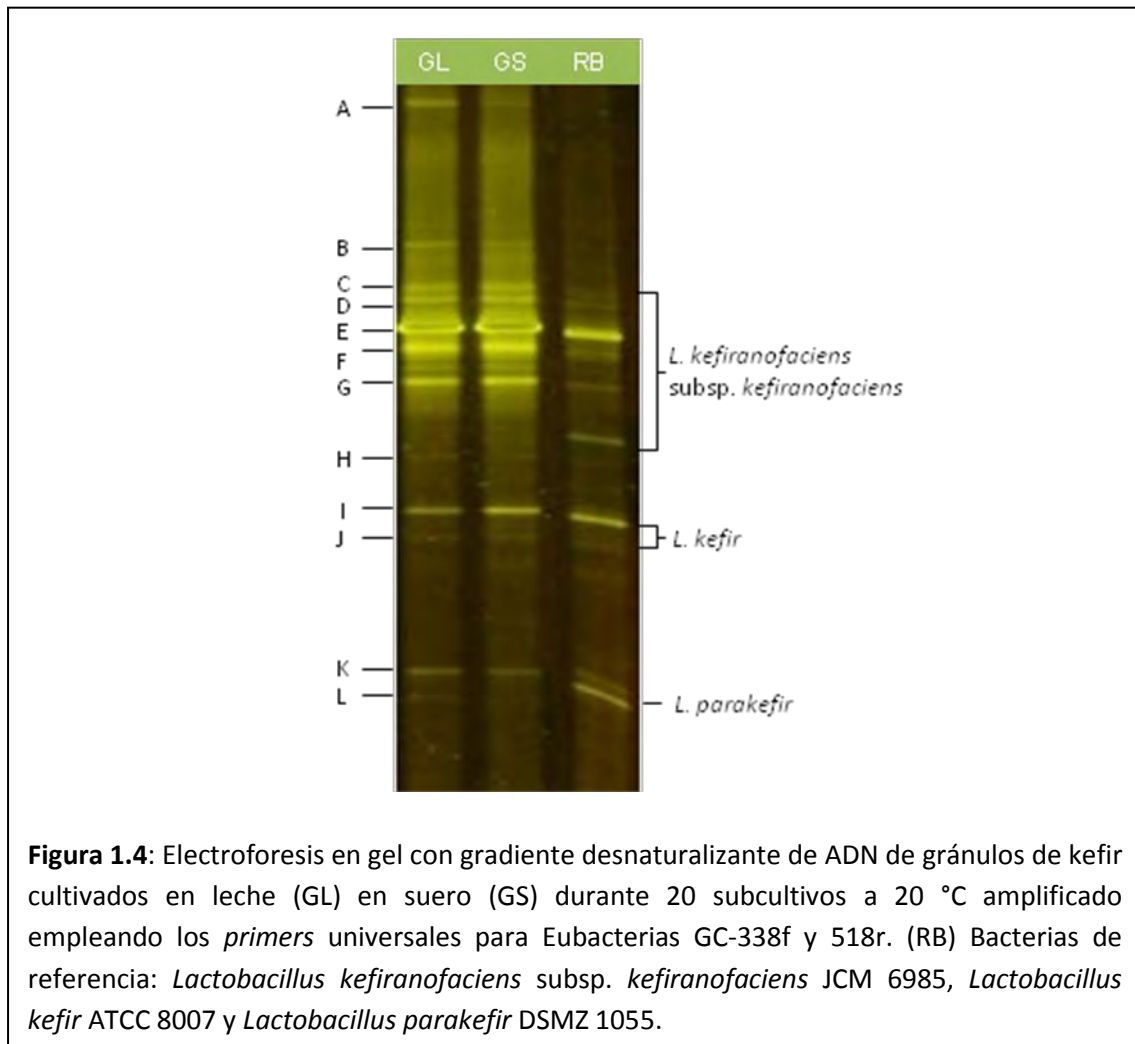
simplicidad, el procedimiento 1 con tratamiento enzimático fue seleccionado para las siguientes extracciones.



**Figura 1.3:** Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante. El ADN fue extraído de gránulos de kefir mediante 4 procedimientos (1 a 4) seguidos de un tratamiento enzimático o sin este tratamiento y luego amplificado por PCR empleando los *primers* universales para Eubacterias GC-338f y 518r (A) o los *primers* universales para levaduras GC-NL1 y LS2 (B).

Se compararon los perfiles DGGE de gránulos de kefir tradicionales crecidos en leche y de los mismos gránulos después de 20 subcultivos en suero a 20 °C. Los perfiles DGGE de bacterias presentes en gránulos de kefir crecidos en leche y suero resultaron idénticos (Figura 1.4).





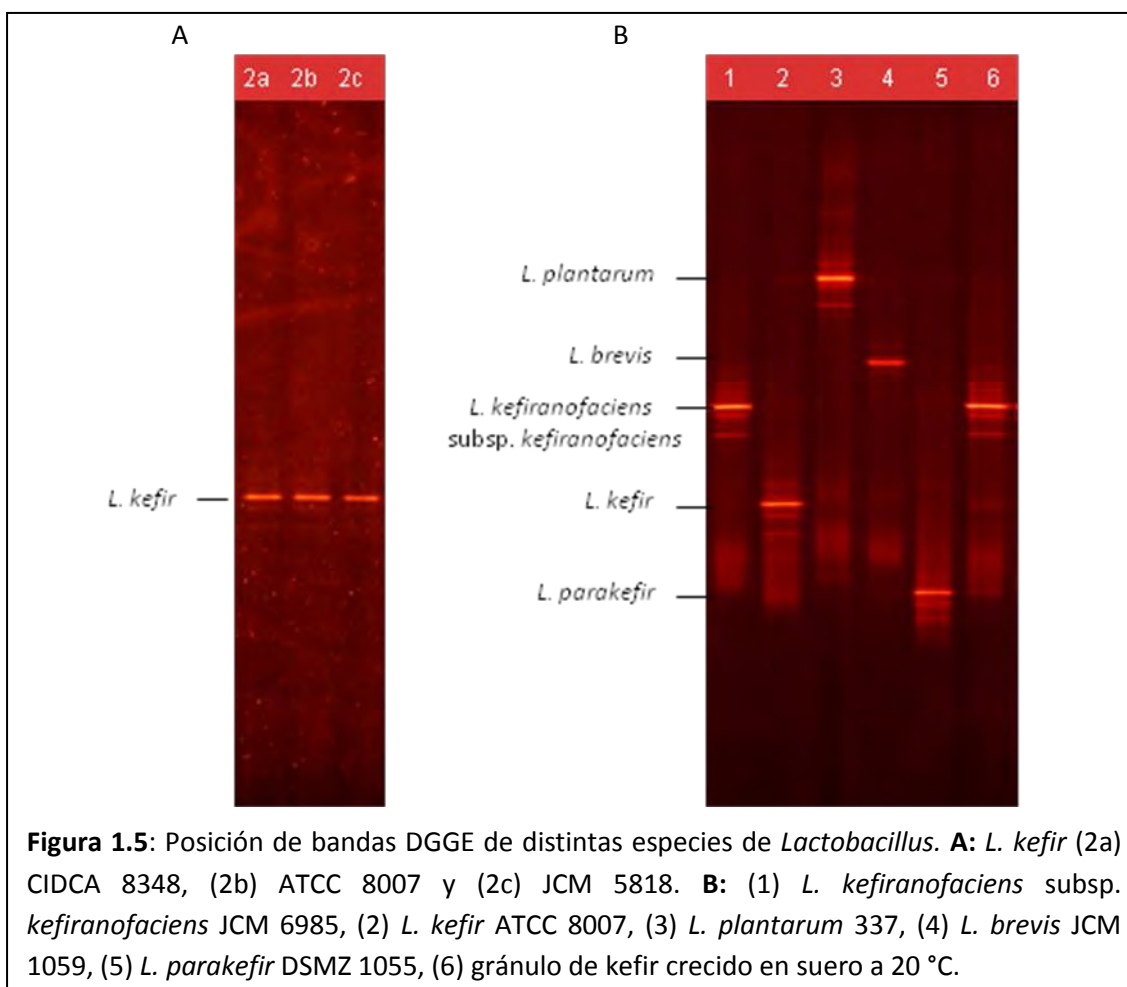
**Figura 1.4:** Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante de ADN de gránulos de kefir cultivados en leche (GL) en suero (GS) durante 20 subcultivos a 20 °C amplificado empleando los *primers* universales para Eubacterias GC-338f y 518r. (RB) Bacterias de referencia: *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985, *Lactobacillus kefir* ATCC 8007 y *Lactobacillus parakefir* DSMZ 1055.

Para la identificación de bandas se analizó el perfil DGGE de especies de bacterias previamente descritas en kefir (Guzel-Seydim y col., 2011): *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus parakefir*, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Acetobacter* sp. Se analizó más de una cepa para las especies: *L. kefir* (CIDCA 8348, ATCC 8007 y JCM 5818), *L. plantarum* (CIDCA 83114 y DSMZ 20174), *L. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* (DSMZ 5016 y JCM 6985) y *L. brevis* (JCM 1059 y ATCC 8287).

Todas las cepas de la misma especie analizadas presentaron bandas en igual posición. En la Figura 1.5 A se muestran como ejemplo las bandas obtenidas para distintas cepas de *L. kefir*. *L. kefir*, *L. parakefir*, *L. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *L. acidophilus*, *L. casei* y



*L. brevis* presentaron bandas en distintas posiciones del gradiente. Sin embargo para *Acetobacter* sp. y *L. plantarum* se obtuvieron bandas en la misma posición. A modo de ejemplo se presenta un gel en el que se incluyen algunas de las cepas bacterianas más frecuentemente descritas en kefir junto con el perfil de bacterias de gránulos crecidos en suero (Figura 1.5 B). Los gránulos de kefir sólo presentaron bandas coincidentes con las de *L. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *L. kefir* y *L. parakefir*. Estas tres especies fueron incluidas en las subsiguientes corridas electroforéticas como referencia.



Chen y col. (2008) analizaron la posición de bandas de DGGE de 20 cepas bacterianas descritas en kefir utilizando los mismos *primers* que en el presente estudio. Empleando un gradiente desnaturalizante 30-50 % obtuvieron bandas en igual posición para *L. brevis* y *L. plantarum*, las cuales se diferenciaron en el presente estudio al utilizar un gradiente 40-60 %. Estos autores obtuvieron bandas en distinta posición para las subespecies *Lb.*

*delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*; y para *Lc. lactis* subsp. *cremoris* y *Lc. lactis* subsp. *lactis*.

La posibilidad de discriminar especies, subespecies y cepas por DGGE está condicionada por varios factores. Por un lado las diferencias que presenten en la secuencia amplificada. Los productos PCR analizados por DGGE tienen una longitud menor a 500 pb siendo frecuente que especies relacionadas no presenten diferencias en esta secuencia (Ercolini, 2004). Está descrito que algunas especies relacionadas tienen secuencias V3 idénticas y no pueden ser distinguidas por DGGE (Ogier y col., 2002). Por otra parte puede suceder que las especies difieran en esta región pero se desnaturalicen a la misma concentración de agente desnaturalizante y por ende migren a la misma posición. También el gradiente urea-formamida empleado incide en el patrón de migración obtenido. Si bien la comparación de la posición de bandas con cepas de referencia resulta de utilidad como una primera aproximación para determinar su identidad, es indispensable recurrir a la secuenciación para lograr una identificación específica de las mismas.

Para la identificación de las bandas presentes en los perfiles DGGE de gránulos de kefir por secuenciación cada una de las bandas indicadas con letras (A–L) en el gel mostrado en la Figura 1.4 fue escindida del gel, clonada, amplificada y secuenciada según se indicó en la sección 12 de Materiales y métodos. Los resultados de la búsqueda de secuencias similares en el GenBank se presentan en la Tabla 1.6.

Las primeras 6 bandas que se observan en los perfiles de ambos gránulos (A a G) alinearon indistintamente con *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* y con *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*. Esto se debe a que la secuencias completa del 16S ADN<sub>r</sub> es idéntica para estas dos subespecies filogenéticamente relacionadas (Ninane y col., 2007).

La banda H alineó con *Lactococcus lactis*, las bandas I y J con *L. kefir* y la banda K con *L. parakefir*. La banda L no pudo identificarse dado que alineó con numerosas especies del género *Lactobacillus*.

**Tabla 1.6:** Porcentaje (%) de similitud de secuencias parciales de 16S ADNr con secuencias presentes en la base de datos del NCBI.

Banda	Especie relacionada	Nº de acceso	% Similitud
A-G	<i>Lactobacillus kefiranofaciens subsp. kefirgranum</i>	AB372208.1	98 (D, F)
	<i>Lactobacillus kefiranofaciens subsp. kefiranofaciens</i>	FJ915793.1	99 (A) 100 (B, C, E, G)
H	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	HM004215.1	100
	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	GU344727.1	100
I	<i>Lactobacillus kefir</i>	AB429371.1	100
J	<i>Lactobacillus kefir</i>	AB429371.1	100
K	<i>Lactobacillus parakefir</i>	AB447485.1	97
L	<i>Lactobacillus kefiranofaciens subsp. kefirgranum</i>	AB372208.1	98
	<i>Lactobacillus kefiranofaciens subsp. kefiranofaciens</i>	FJ915793.1	98
	<i>Lactobacillus crispatus</i>	AY339180.1	98
	<i>Lactobacillus jensenii</i>	AY262343.1	98
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	GU454853.1	98
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	GU560037.1	98

Las secuencias de bandas DGGE constituyen fragmentos cortos de ADN (menores a 500 pb) que pueden presentar escasa o nula variación entre especies relacionadas, lo que dificulta la identificación. A esto se suma la dificultad impuesta por la heterogeneidad de secuencias para una misma especie depositadas en la base de datos. Se han descrito niveles inesperadamente altos de variación intraespecífica de las secuencias del ARNr de la subunidad pequeña del ribosoma de procariontes depositadas en GenBank (Clayton y col., 1995). Si bien esto se ha atribuido frecuentemente a errores metodológicos (Lin y col., 2008b) hay quienes sostienen que no puede descartarse que la variabilidad intraespecífica sea mayor de lo que hasta el momento se ha creído (Clayton y col., 1995). Esto afecta críticamente la utilidad informativa de las secuencias y puede conducir a errores en la identificación o a identificaciones ambiguas, tales como el alineamiento de una banda con múltiples secuencias, como se obtuvo para la banda L.

Siete bandas del perfil DGGE de gránulos de kefir alinearon con *L. kefiranofaciens* sin discriminar subespecie y dos con *L. kefir*. Asimismo se observaron bandas múltiples para las cepas de referencia pertenecientes a estas 2 especies.

La multiplicidad de bandas para una determinada especie es comúnmente atribuida a múltiples copias heterogéneas del gen del ARNr 16S. Se ha descrito que el número de copias del operon ribosómico por genoma bacteriano varía considerablemente, de 1 a 15 (Klappenbach y col., 2001). Scheirlinck y col. (2008) reportaron que el 54 % de 1194 BAL aisladas de masa fermentada presentaban más de una banda al ser analizadas por DGGE. En concordancia con esta observación, las 17 especies del género *Lactobacillus* sp. consideradas en la base de datos rrndb (The Ribosomal RNA Operon Number Database: <http://rrndb.cme.msu.edu>) poseen entre 5 y 9 copias del ADNr 16S, con un promedio de 5.36 copias.

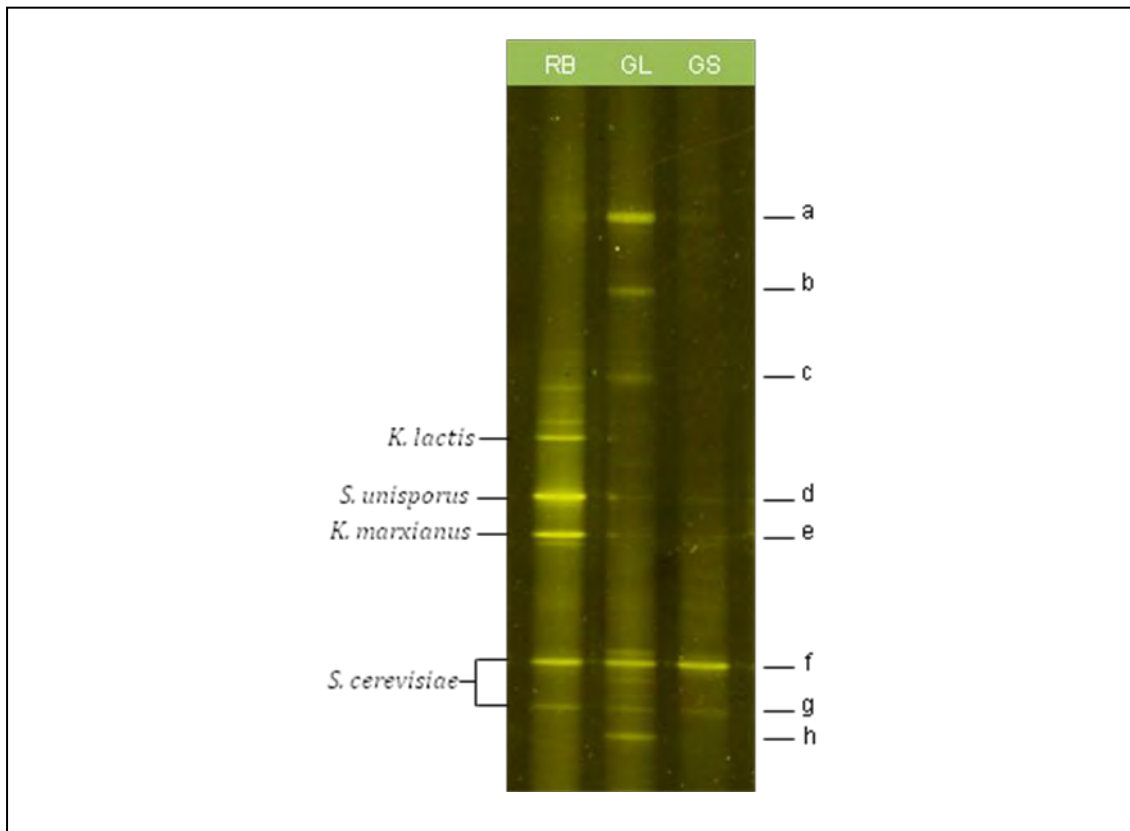
Las copias de los genes ADNr del mismo genoma pueden presentar cierto grado de heterogeneidad, denominada microheterogeneidad. En general las secuencias difieren en menos de 15 posiciones sin embargo se han descrito diferencias de hasta 70 posiciones (Rastogi y col., 2009; Mylvaganam y col., 1994). Pei y col (2010) describieron que el 74 % de las especies, de las cuales se conoce el genoma completo y presentan copias múltiples del ADNr 16S, tienen variaciones entre las copias de este gen que se encuentran entre 0.06 y 20.38 %, con un promedio de 0.55 %. Estos investigadores estimaron que la probabilidad de encontrar especies cuya variabilidad en la secuencia del ADNr 16S sea mayor a un 1 % en una comunidad es de aproximadamente 4.2 %.

De acuerdo a los datos antes mencionados, es frecuente hallar copias múltiples diferentes del gen ADNr 16S para especies de *Lactobacillus* sp., mientras que la probabilidad de que estas copias sean suficientemente diferentes para obtener múltiples bandas en un perfil DGGE es baja aunque no inexistente. De manera que es posible que la multiplicidad de bandas observadas para *L. kefiranofaciens* y *L. kefir* se deba a este fenómeno. Otros autores han descrito que la alta frecuencia de especies de BAL que presentan multiplicidad de bandas DGGE podría deberse a que presentan variabilidad en la región V3 entre copias del ADNr 16S (De Araújo y Schneider, 2008; Scheirlinck y col., 2008).

La presencia de copias levemente diferentes de ADNr 16S puede además acentuar la formación de moléculas heteroduplex, dado que su presencia es mayor cuando más similares sean las secuencias (Dahllof y col., 2000). Debido a la desigualdad entre las

secuencias los heteroduplex, los mismos suelen formar bandas en zonas donde el gradiente desnaturizante es menor (Muyzer y Smalla, 1998). Esto conduciría a la obtención de bandas en posiciones alejadas del gradiente aún cuando las secuencias presentan escasas diferencias.

Se analizó también la similitud entre los perfiles DGGE de levaduras presentes en gránulos cultivados en leche y suero. Los perfiles obtenidos presentaron algunas similitudes y diferencias (Figura 1.6). Se detectaron 5 bandas coincidentes entre ambos perfiles, señaladas en la Figura 1.6 con las letras b, d, e, f y g. Mientras que las bandas indicadas como a, c y h se detectaron en el perfil DGGE de gránulos cultivados en leche y no en el de aquellos cultivados en suero.



**Figura 1.6:** Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante de ADN de gránulos de kefir cultivados en leche (GL) en suero (GS) durante 20 subcultivos a 20 °C amplificado empleando los *primers* universales para levaduras GC-NL1 y LS2. (RL) Levaduras de referencia: *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces unisporus* CIDCA 81107, *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154, y *Saccharomyces cerevisiae* CIDCA 8112.

Se incluyeron en el análisis levaduras de identidad conocida, que habían sido previamente aisladas a partir de gránulos de kefir: *Saccharomyces unisporus*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Se hallaron en los perfiles de ambos productos bandas coincidentes con *S. unisporus*, *K. marxianus* y *S. cerevisiae*.

Las bandas se escindieron del gel, se re-amplificaron mediante los mismos *primers* sin la cola GC y se analizaron por secuenciación. Los resultados obtenidos de la contrastación de las secuencias con la base de datos del NCBI se presentan en la Tabla 1.7.

**Tabla 1.7:** Porcentaje (%) de similitud de secuencias parciales de 26S ADNr con secuencias presentes en la base de datos del NCBI.

Banda	Especie relacionada	Número de acceso	% Similitud
a	<i>Kazachstania exigua</i>	EU982209.1	100
	<i>Kazachstania turicensis</i>	EU982208.1	100
b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EU441887.1	100
c	No se hallaron similitudes significativas		
d	<i>Kazachstania unispora</i>	GQ222348.1	97
	<i>Kazachstania servazzii</i>	FM200037.1	97
	<i>Kazachstania aquatica</i>	AB500207.1	97
e	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	GQ179986.1	100
f	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BK006945.1	100
g	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EU441887.1	100
h	<i>Kazachstania exigua</i>	EU982209.1	100
	<i>Kazachstania turicensis</i>	EU982208.1	100

Por secuenciación se confirmó la presencia de *K. marxianus* (banda e) y de *S. cerevisiae* (bandas b, f y g) en los gránulos de kefir crecidos en ambos sustratos, observada también por comparación de la posición de bandas. Mientras que se determinó la presencia de *Kaz. exigua* o *Kaz. turicensis* (bandas a y h) sólo en gránulos crecidos en leche.

La banda c, que sólo estuvo presente en gránulos de leche, no pudo identificarse dado que no alineó con ninguna secuencia disponible en la base de datos. Esto podría deberse a que corresponde con una especie cuya secuencia del ADNr 26S no se halla incluida en la base de datos. También podría corresponder a un heteroduplex, una molécula quimérica u otro un artefacto generado durante la PCR (Kanagawa, 2003), sin embargo esto es poco probable

dado que la banda se obtuvo reiteradas veces en corridas realizadas a partir de distintos productos PCR.

Para las bandas a, d y h la identificación fue ambigua, alineando la misma banda con distintas especies. Esto podría deberse a que las especies no difieren en la región D1 del ADNr 26S que fue secuenciada. Las tres especies de *Kazachstania* (*Kaz. aquatica*, *Kaz. servazzii* y *Kaz. unispora*) que alinearon con la banda d, se encuentran próximas filogenéticamente. Se ha descrito que sus secuencias en regiones D1/D2 del ADNr 26S difieren en menos del 3 % (Wu y Bai, 2005). Asimismo *Kaz. exigua* y *Kaz. turicensis* que alinearon con el mismo porcentaje de similitud con las bandas a y h son especies estrechamente relacionadas (Lee y col., 2009).

Por lo tanto, del análisis DGGE de gránulos de kefir cultivados en leche y suero se obtuvieron perfiles idénticos para bacterias y similares para levaduras. Mediante este método se detectó la presencia de *L. kefiranofaciens*, *L. parakefir*, *L. kefir*, *Lc. lactis*, *K. marxianus* y *S. cerevisiae* en gránulos de kefir crecidos en leche y suero. Mientras que *Kazachstania exigua* o *Kazachstania turicensis* y la banda c, que no alineó con ninguna secuencia disponible en la base de datos del GenBank, estuvieron presentes sólo en gránulos de kefir crecidos en leche, indicando una reducción de la diversidad de levaduras al emplear suero como sustrato.

En concordancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo Magalhães y col. (2010) describieron la presencia de *L. kefiranofaciens*, *S. cerevisiae*, *S. unisporus* y *K. marxianus* en gránulos de kefir luego de una fermentación de suero. Aunque en el presente estudio se lograron detectar más especies en gránulos crecidos durante 20 subcultivos en este sustrato.

A pesar que se ensayaron distintos métodos de extracción de ADN y se empleó Sybr Gold para mejorar la resolución de los perfiles DGGE, no se obtuvo la diversidad microbiológica esperada de acuerdo a lo descrito previamente por el empleo de métodos de cultivo tradicionales (Garrote y col., 2001; Simova y col., 2002; Loretan y col., 2003; Witthuhn y col., 2004). La dificultad para detectar ciertas especies por PCR-DGGE puede deberse a su

baja concentración, su alta resistencia a los agentes líticos utilizados o a la amplificación preferencial de determinados ADN moldes (Muyzer y Smalla, 1998; Ercolini, 2004; De Araújo y Schneider, 2008).

Chen y col. (2008) analizaron la diversidad microbiana de distintos gránulos de kefir taiwaneses mediante métodos de cultivo y por DGGE y hallaron que mientras que algunas bacterias identificadas por técnicas de cultivo no eran detectadas por DGGE, este último método permitía la detección de otras que no habían sido aisladas. De manera similar, en este trabajo no se encontraron representadas en el perfil DGGE algunas especies bacterianas previamente aisladas de gránulos de kefir de la colección del CIDCA tales como *L. plantarum* y *Acetobacter* sp. (Garrote y col., 2001). Por otro lado, fue posible detectar la presencia de *L. kefiranofaciens* y *Kaz. exigua* o *Kaz. turicensis* que no habían sido anteriormente aisladas de gránulos de kefir de la colección.

En esta primera etapa del estudio, se demostró la similitud de gránulos de kefir provenientes de leche respecto a aquellos subcultivados reiteradas veces en suero en cuanto a su crecimiento, aspecto macroscópico, composición química y composición microbiológica cuantitativa y cualitativa. De manera que el suero es un sustrato adecuado para la fermentación con gránulos de kefir, permitiendo que los mismos se conserven como *starters*.

## **1. 2 Análisis de leche y suero fermentados con gránulos de kefir**

Los gránulos de kefir crecidos en suero durante 20 subcultivos, caracterizados en la sección 1.1, fueron empleados para fermentar suero durante 24 h a 20 °C. El producto obtenido fue analizado en cuanto a su pH, contenido de ácidos orgánicos, concentración de lactosa y composición microbiológica comparativamente con el producto obtenido de la fermentación de leche en iguales condiciones.

Durante la fermentación de suero con 10 % p/v de gránulos de kefir el pH descendió de 6.3 a 3.6, fundamentalmente por la producción de ácido láctico que aumentó de 0.05 % a 0.90 %. Durante el proceso se degradó un 49 % de la lactosa presente en el suero, que descendió



de 6.5 % a 3.3 %. El producto obtenido al fermentar leche presentó mayor pH y similar contenido de ácido láctico y lactosa que el suero fermentado (Tabla 1.8).

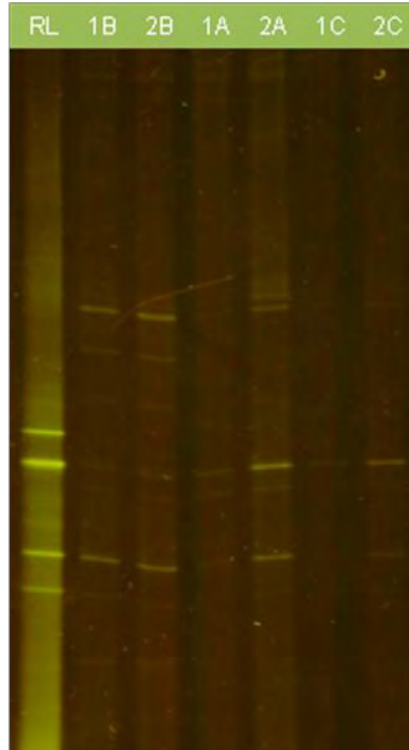
La composición microbiológica se analizó mediante recuentos de viables en placa. El contenido de bacterias ácido lácticas en suero fermentado con gránulos de kefir fue significativamente menor y el de levaduras significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) que en leche fermentada (Tabla 1.8).

**Tabla 1.8:** Composición microbiológica cuantitativa, pH, concentración de ácido láctico y de lactosa de leche y suero fermentados 24 h con 10 % p/v de gránulos de kefir a 20 °C.

	BAL (UFC/ml)	Levaduras (UFC/ml)	pH	Ácido láctico (%)	Lactosa (%)
Leche	$3.9 \pm 3.1 \times 10^8$ <sup>a</sup>	$8.8 \pm 5.4 \times 10^5$ <sup>a</sup>	$3.9 \pm 0.1$ <sup>a</sup>	$1.20 \pm 0.18$ <sup>a</sup>	$3.8 \pm 0.5$ <sup>a</sup>
Suero	$1.0 \pm 0.7 \times 10^7$ <sup>b</sup>	$4.2 \pm 1.7 \times 10^6$ <sup>b</sup>	$3.6 \pm 0.1$ <sup>b</sup>	$0.90 \pm 0.03$ <sup>a</sup>	$3.3 \pm 0.9$ <sup>a</sup>

\* Dentro de la misma columna letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ ) evaluadas mediante test T de student.

Para analizar por DGGE la diversidad microbiana de los productos fermentados se evaluaron previamente distintos procedimientos de extracción de ADN (Materiales y métodos, sección 9.2). Cuando se amplificó con *primers* universales para Eubacterias, se obtuvieron perfiles idénticos con todos los métodos coincidiendo con los resultados obtenidos en las muestras de gránulos de kefir. Cuando se amplificó con *primers* universales para levaduras se obtuvieron perfiles con mayor número de bandas para los procedimientos que incluyeron un tratamiento enzimático con liticasa (Figura 1.7, calles 1B y 2B). El procedimiento 1B se seleccionó para extracciones subsiguientes por ser el más sencillo metodológicamente.

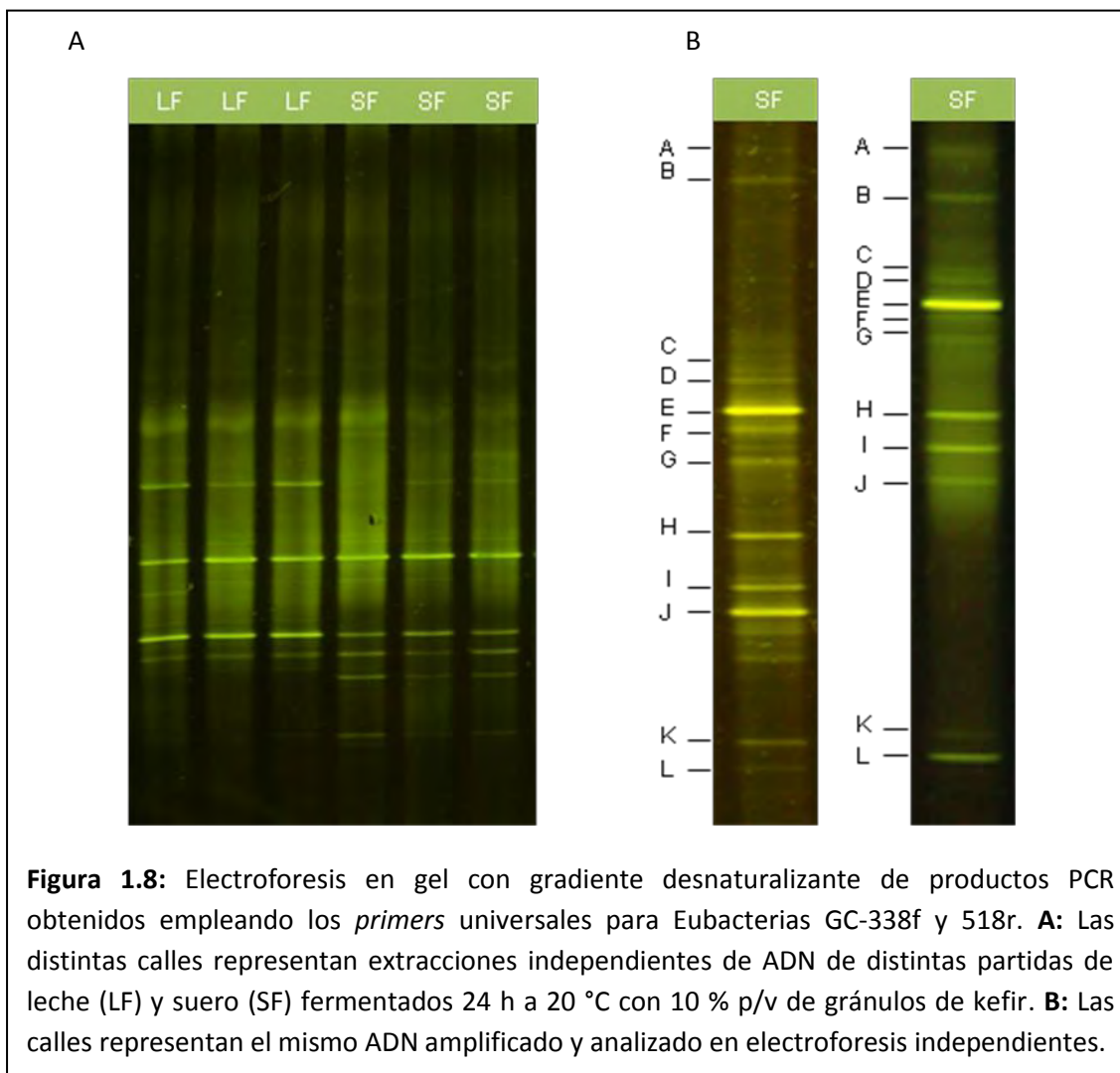


**Figura 1.7:** Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante de productos de amplificación de ADN de leche fermentada 24 h a 20 °C con 10 % p/v de gránulos de kefir obtenidos empleando los *primers* universales para levaduras GC-NL1 y LS2. En las calles 1B a 2C se muestran distintos procedimientos de extracción de ADN. (RL) Levaduras de referencia: *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces unisporus* CIDCA 81107, *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 y *Saccharomyces cerevisiae* CIDCA 8112.

Se estudió la repetitividad de los perfiles al emplear ADN extraído a partir de 3 partidas distintas del mismo producto fermentado y en distintas corridas electroforéticas. Los perfiles obtenidos en extracciones independientes fueron idénticos. Se presenta a modo de ejemplo un gel en el que se muestra el perfil DGGE de bacterias presentes en suero y leche fermentados con gránulos de kefir obtenidos de muestras independientes (Figura 1.8 A).

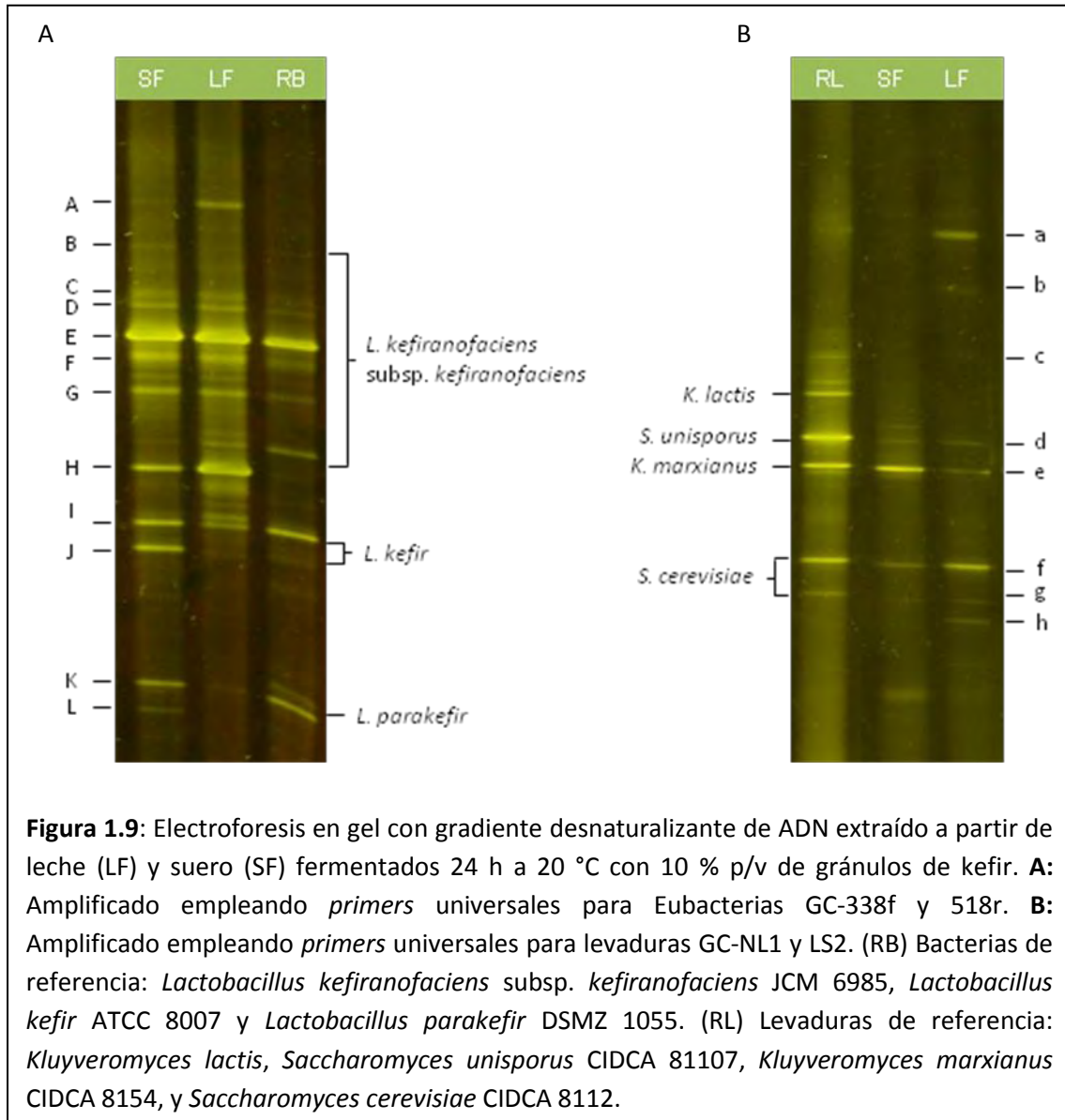
En cuanto a los perfiles obtenidos en distintas electroforesis existieron diferencias en la distancia recorrida por las bandas en el gel. Esto podría estar asociado con la formación desigual del gradiente desnaturalizante. Por otro lado, se observaron diferencias en la intensidad de la misma banda entre distintos geles, aunque la intensidad relativa entre bandas del mismo perfil se mantuvo constante. Esto podría atribuirse a una eficiencia diferencial de la amplificación y/o tinción entre ensayos. Se muestran como ejemplo 2

ensayos DGGE de la misma muestra de ADN en las cuales se evidencian las dificultades antes señaladas (Figura 1.8 B). Pueden notarse que en la corrida presentada a la izquierda todas las bandas se visualizan con mayor intensidad que en la de la derecha, asimismo se observan diferencias en la distancia relativa entre bandas. Para poder comparar perfiles de distintas corridas electroforéticas se utilizaron en todos los geles patrones conformados por cepas de bacterias y levaduras de referencia.



Una vez seleccionado el protocolo de extracción y analizada la repetitividad de extracciones de ADN de productos fermentados obtenidos independientemente y de distintas corridas electroforéticas, se analizaron comparativamente la diversidad de especies en leche y suero

fermentados. Se observaron diferencias en la intensidad de ciertas bandas de los perfiles DGGE (Figura 1.9).



Por comparación de bandas con cepas de identidad conocida y secuenciación se detectó en los perfiles de bacterias de ambos productos la presencia de *L. kefiranofaciens* (bandas A a G), *Lc. Lactis* (banda H), *L. kefir* (bandas I y J) y *L. parakefir* (banda K). Sin embargo, las bandas correspondientes con *L. kefir* y *L. parakefir* presentaron menor intensidad en leche que en suero fermentado (Figura 1.9 A).

Con respecto a las levaduras en ambos productos se detectó la presencia de *S. unisporus* (banda d), *K. marxianus* (banda e) y *S. cerevisiae* (bandas f y g). Tal como se observó en gránulos de kefir, las bandas correspondientes a *Kaz. exigua* o *Kaz. turicensis* (a y h) se detectaron en leche pero no en suero fermentado, mientras que la banda e correspondiente a *K. marxianus* tuvo mayor intensidad en suero que en leche fermentada (Figura 1.9 B).

La mayor intensidad de las bandas correspondientes a *L. kefir*, *L. parakefir* and *K. marxianus* observada en el producto fermentado obtenido en suero respecto al de leche, podría indicar una mayor concentración de estas especies en el suero fermentado ya que la intensidad de cada banda es generalmente considerada una medida semi-cuantitativa de una determinada especie en la comunidad (Illian y col., 2009). Sin embargo la relación entre la intensidad de las bandas de DGGE y la cantidad de ADN molde no es siempre lineal. En PCR multi-molde algunos mecanismos pueden favorecer la ampliación de determinados moldes debido a las propiedades de los genes, de sus secuencias adyacentes, o del genoma total, lo que puede causar que la abundancia relativa de los productos finales de amplificación no refleje necesariamente la relación de genes en la mezcla inicial (Polz y Cavanaugh, 1998). Entre los factores que más contribuyen a la amplificación diferencial se pueden mencionar la desnaturalización preferencial debido al bajo contenido de G-C, la accesibilidad diferencial de los genes codificantes para ARNr dentro del genoma, la interferencia de secuencias adyacentes, la afinidad de los *primers* por la secuencia blanco y el número de copias de los genes (Suzuki y Giovannoni, 1996; Hansen y col., 1998; Farrelly y col., 1995; Kanagawa, 2003). De Araujo y Scheider (2008) demostraron que estos errores pueden conducir a fallas en la determinación de las especies dominantes en comunidades microbianas analizadas por DGGE.

En concordancia con los resultados del presente trabajo, Magalhães y col. (2010) hallaron la presencia de *S. unisporus*, *K. marxianus* y *S. cerevisiae* en suero fermentado durante 48 y 72 h con gránulos de kefir mediante DGGE analizando secuencias de la región ITS (*primers* GC-ITS1/ITS2) y del ADNr 18S (*primers* GC-NS3/YM951). Amplificando la región V6-V8 (*primers* GC-968f/1401r) y la región V3 del ADNr 16S (*primers* GC-338f/518r) estos autores sólo

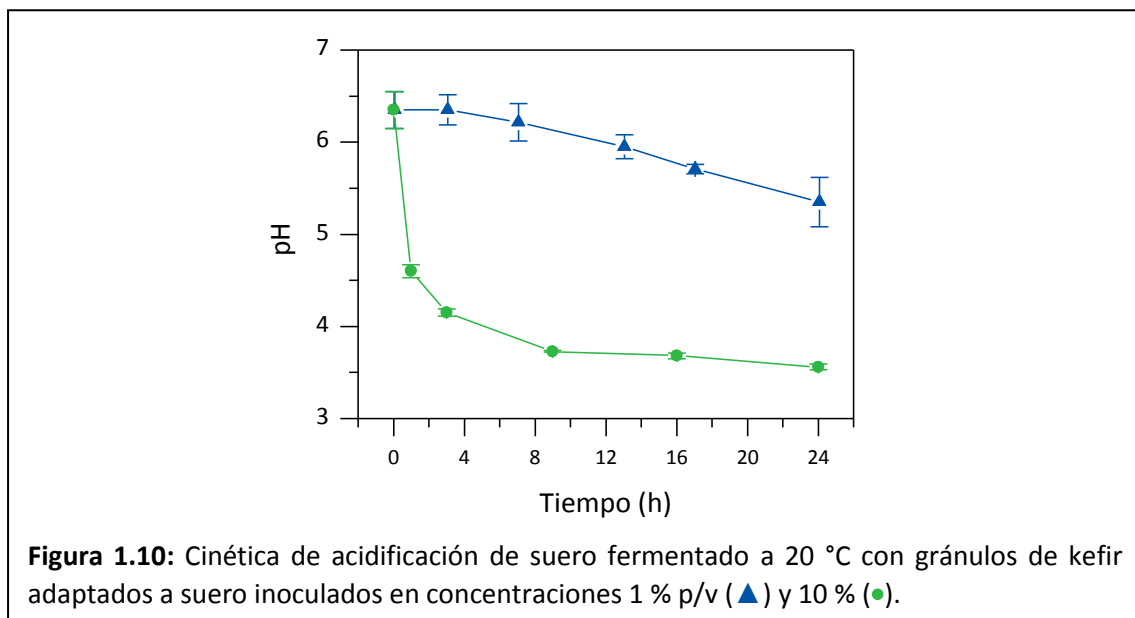
podieron identificar en estos productos una banda correspondiente con *L. kefiranofaciens* y una banda que alineó con la secuencia de una bacteria del género *Lactobacillus* sp. no identificada a nivel especie.

## 2. Efecto de la variación del porcentaje de gránulos de kefir inoculados, el tipo de suero y la temperatura de incubación

### 2.1 Fermentación de suero con distintos porcentajes de gránulos de kefir

Uno de los factores que afectan las características del producto obtenido es la relación gránulo de kefir/sustrato. Empleando los gránulos de kefir adaptados a suero, que fueron caracterizados en la sección 1.1, se estudió la influencia de la variación de la proporción del inóculo *starter* sobre el aumento de biomasa de los gránulos y sobre la composición microbiológica, el contenido de lactosa, el pH y la concentración de ácidos orgánicos del suero fermentado 24 h a 20 °C.

El aumento de biomasa de los gránulos inoculados en suero en concentración 1 % fue  $0.37 \pm 0.11$  g/g, aproximadamente 4 veces mayor que cuando los mismos se sembraron en concentración 10 % ( $0.076 \pm 0.04$  g/g).



Cuando se analizaron comparativamente las cinéticas de acidificación pudo notarse que, a diferencia del descenso abrupto de pH que ocurrió durante las primeras horas de incubación cuando la concentración de gránulos fue 10 % p/v (de pH 6.3 a  $4.4 \pm 0.1$  en 2 h), cuando se emplearon gránulos en concentración 1 % p/v el pH descendió gradualmente durante la fermentación presentando el producto luego de 24 h un pH de  $5.3 \pm 0.2$  (Figura 1.10).

En concordancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo en suero, Garrote y col. (1998) describieron que al fermentar leche con gránulos de kefir en concentración 10 % la acidificación ocurre más rápidamente que al emplearlos al 1 %.

Magalhães y col. (2011b) describieron una cinética de acidificación de suero con 5 % p/v de gránulos de kefir similar a la obtenida en el presente estudio con gránulos en concentración 10 % p/v. Estos autores hallaron que el pH desciende abruptamente durante las primeras horas de fermentación y luego se estabiliza en valores próximos a 4.

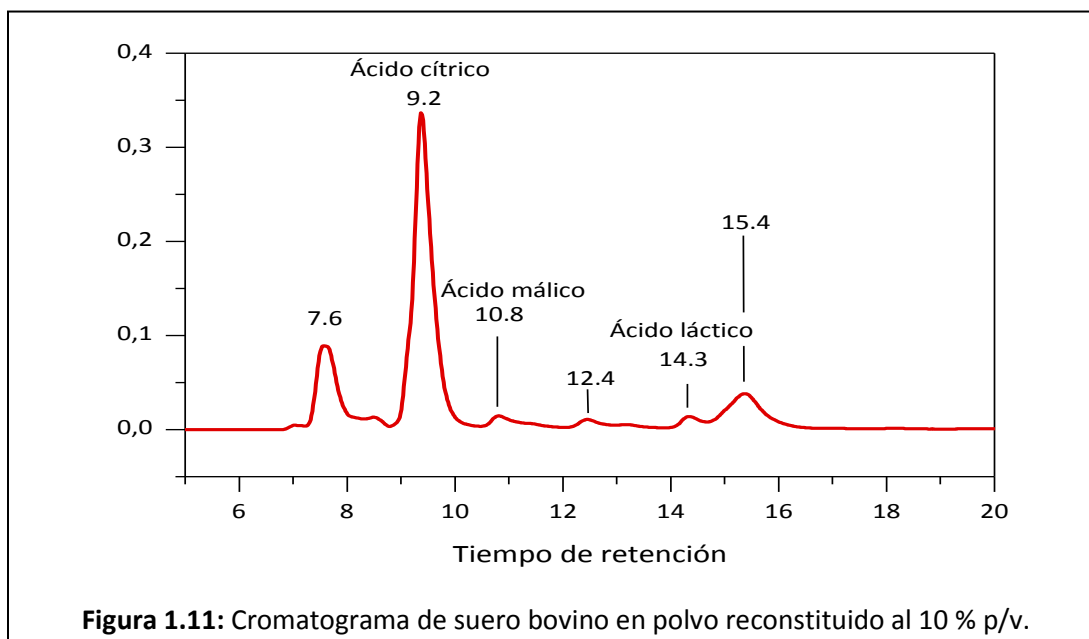
En cuanto a la composición microbiológica, se observó un contenido similar de levaduras en el suero fermentado con gránulos de kefir en concentración 1 % ( $1.7 \pm 0.6 \times 10^6$  UFC/ml) y 10 % ( $4.2 \pm 1.7 \times 10^6$  UFC/ml). Sin embargo el contenido de BAL fue un orden logarítmico mayor cuando los gránulos se inocularon en menor proporción ( $1.5 \pm 1.0 \times 10^8$  vs.  $1.0 \pm 0.7 \times 10^7$  UFC/ml).

Al analizar la composición microbiológica del suero fermentado con 10 % p/v de gránulos de kefir a las 4 h de fermentación (pH 4) se halló que el contenido de BAL fue  $1 \times 10^7$  UFC/ml y el de levaduras de  $2 \times 10^6$  UFC/ml, de manera que la concentración de microorganismos no aumentó en las siguientes horas de incubación. La menor concentración de BAL hallada en suero fermentado con 10 % de gránulos de kefir podría relacionarse con una reducción de la tasa de crecimiento debida al bajo pH ya que este permanece a valores inferiores a 4 luego de 4 h de incubación y a alta concentración de ácido láctico. Las altas concentraciones de ácido láctico no disociado suelen ser el principal factor que limita el crecimiento de las BAL (Bouguettoucha y col., 2011). El descenso más gradual de pH durante la fermentación con 1 % de gránulos de kefir podría permitir un mayor crecimiento microbiano durante el período de incubación.

Asimismo es posible que el crecimiento se encuentre limitado por la escasez de nutrientes. Las BAL son microorganismos fastidiosos respecto a los requerimientos nutricionales, precisando medios ricos para su crecimiento. El nitrógeno podría actuar como nutriente limitante del crecimiento, ya que se ha descrito que el crecimiento de BAL en suero es insuficiente sin la adición de fuentes externas de nitrógeno (Burns y col., 2008). Debe considerarse que, además de los microorganismos que son liberados al medio, aquellos contenidos en los gránulos permanecen activos metabólicamente, estando en cantidad 10 veces superior al inocular los gránulos al 10 % que al emplearlos al 1 %. De manera que es esperable que los nutrientes se agoten con anterioridad durante la fermentación de suero con 10 % de gránulos de kefir, siendo otra alternativa para explicar la menor concentración de BAL en el producto fermentado obtenido.

Se analizó posteriormente la producción de ácidos orgánicos durante la fermentación. Esta es una característica importante, debido a que los ácidos orgánicos están vinculados con las propiedades organolépticas e inhibitorias de los productos fermentados. En el cromatograma de suero sin fermentar se obtuvieron 3 picos pronunciados a tiempos de retención 7.6, 9.2 y 15.4 min (Figura 1.11). El pico a tiempo 9.2 min correspondió a ácido cítrico mientras que los otros 2 picos no coincidieron con el tiempo de retención de ninguno de los ácidos orgánicos incluidos como referencia: oxálico (8.2 min), cítrico (9.2 min), ascórbico (10.1 min), pirúvico (10.6 min), málico (10.8 min), succínico (13.0 min), láctico (14.4 min), fórmico (15.7 min), acético (17.0 min), propiónico (20.0 min) y butírico (24.1 min). Asimismo se observaron picos de menor área con tiempos de retención equivalentes a ácido málico, láctico y a un ácido no identificado a tiempo de retención 12.4 min.

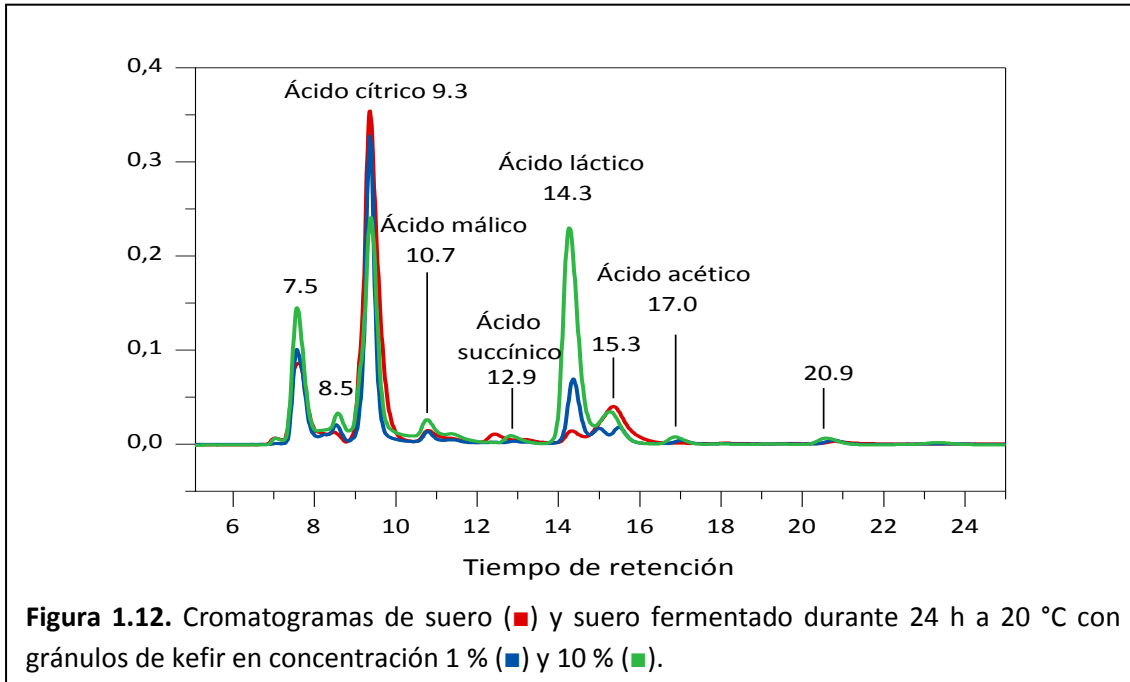




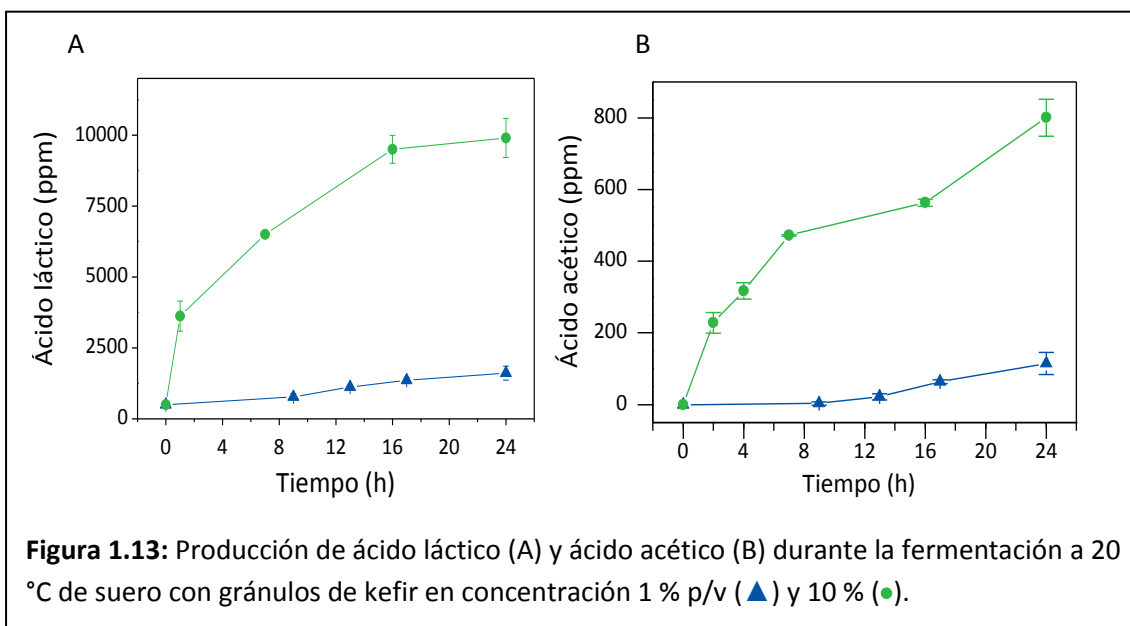
Las concentraciones de ácidos cítrico, láctico y acético fueron calculadas mediante curvas de calibración construidas con soluciones de ácidos con concentración conocida. El suero presentó un contenido de ácido cítrico de  $0.84 \pm 0.07$  g/100ml, de ácido láctico de  $0.05 \pm 0.01$  g/100ml y de ácido acético de  $0.014 \pm 0.003$  g/100ml. Estos valores son similares a los descritos por Mullin y Emmons (1997) para suero de queso Cheddar que presenta una concentración de ácido cítrico entre 0.10 y 0.16 g/100ml, de ácido láctico entre 0.02 y 0.04 g/100ml y trazas de ácido acético. La concentración de ácidos orgánicos en los quesos y sueros es variable dependiendo el tipo de suero e incluso puede diferir entre partidas de la misma variedad de queso (Mullin y Emmons, 1997).

Al fermentar suero con 10 % de gránulos de kefir se observó un aumento de las áreas bajo los picos con tiempos de retención equivalentes a los ácidos málico, láctico, acético, succínico y de otros a tiempo de retención 7.5, 8.5, 20.9 min que no pudieron ser identificados. Mientras que la concentración de ácido cítrico fue menor en el producto fermentado que en el suero (Figura 1.12).

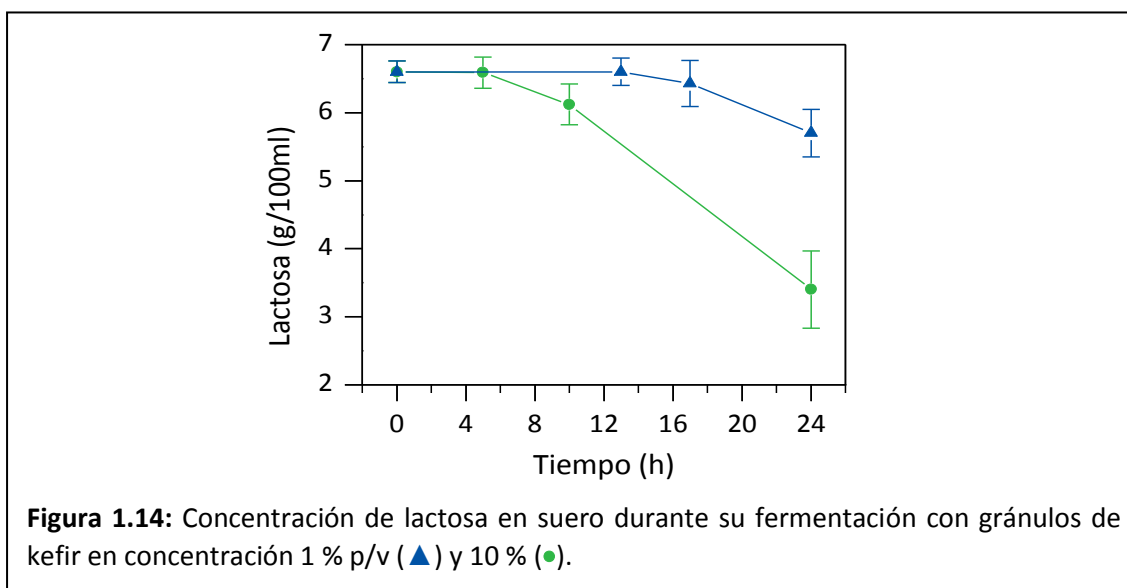
Cuando la fermentación se llevó a cabo con gránulos en concentración 1 % se obtuvo una variación similar de los ácidos orgánicos, aunque no se observó producción de ácido succínico. La producción de ácidos orgánicos fue notoriamente menor al emplear gránulos en menor proporción, en correspondencia con el mayor pH del producto.



Se cuantificó la concentración de ácido láctico y acético en ambos productos a lo largo de la fermentación. En 24 h el suero fermentado con gránulos en concentración 1 % presentó  $1610 \pm 250$  ppm (0.16 %) de ácido láctico y  $115 \pm 31$  ppm (0.01 %) de acético, en tanto que al emplear gránulos al 10 % las concentraciones fueron  $9000 \pm 690$  ppm (0.90 %) y  $800 \pm 51$  ppm (0.08 %) respectivamente. La producción de ambos ácidos fue notoriamente menor al emplear menor inóculo (Figura 1.13).



El consumo de lactosa comenzó luego de 5 h de incubación cuando se emplearon gránulos de kefir en concentración 10 %, mientras que cuando se utilizaron al 1 % hubo un período de 13 h antes de observarse descenso en el contenido de lactosa del suero (Figura 1.14). Asimismo la concentración de lactosa remanente en el producto resultó superior cuando se inocularon gránulos en menor concentración.



Este análisis permitió determinar que al inocular de gránulos de kefir en concentración 10 % p/v hay mayor acidificación, producción de ácidos orgánicos y consumo de lactosa durante la fermentación de suero que cuando se inoculan al 1 % p/v. A pesar de que el crecimiento de los gránulos de kefir y la concentración de BAL en el suero fermentado fueron mayores al utilizar gránulos al 1 % p/v, se optó por emplear la mayor concentración de inóculo en los siguientes estudios a fin de acelerar el proceso de fermentación.

## 2.2 Empleo de distintos sueros como sustrato

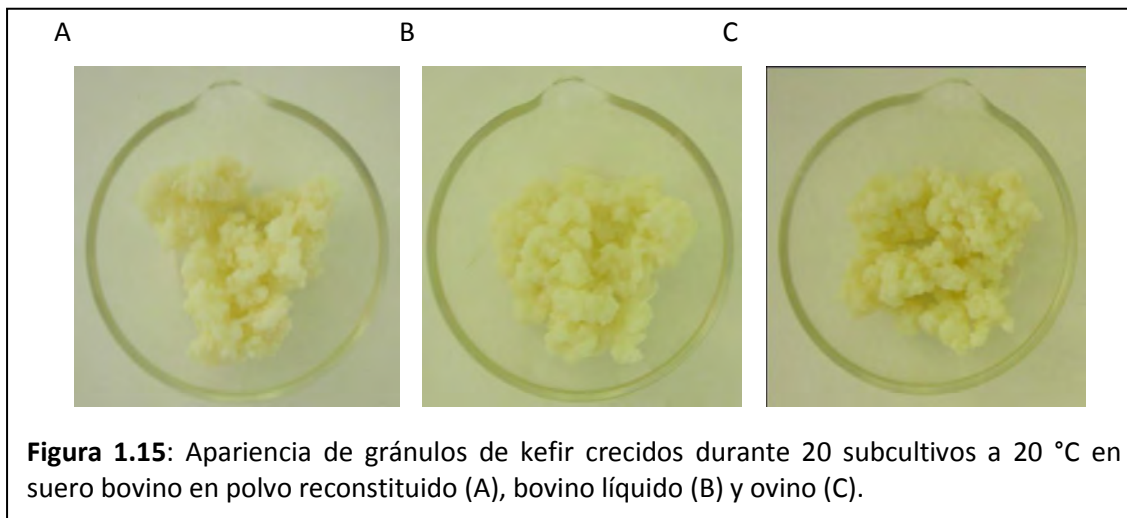
La composición del suero es variable según la leche a partir de la cual se fabrique el queso y de su proceso de elaboración. Si bien el queso elaborado a partir de leche de vaca es el más popular, en algunas regiones del mundo la leche de cabra y de oveja son utilizadas en la manufactura de productos lácteos lo que resulta en la generación de suero de distintos orígenes. A fin de determinar si la utilización de distintos sueros afecta las características del producto obtenido se analizaron comparativamente los productos de fermentación de 3

sueros de quesería: dos provenientes de quesos de origen bovino (uno de ellos deshidratado por secado en spray) y uno de origen ovino. Se determinó la composición química de los 3 tipos de suero empleados como sustrato, observándose diferencias en su contenido de lípidos, proteínas, lactosa y minerales (Tabla 1.9). Cabe señalar que antes de realizar el análisis físico-químico el suero en polvo se reconstituyó en agua al 10 % p/v.

**Tabla 1.9:** Composición química de distintos sueros empleados como sustrato

	Bovino en polvo reconstituido al 10 % p/v	Bovino líquido	Ovino líquido
Proteínas (g/100g)	1.0	1.3	1.6
Lípidos (g/100ml)	<0.3	0.4	0.7
Lactosa (g/100g)	6.5	7.1	4.6
Humedad (g/100ml)	91.3	88.7	90.7
Cenizas (g/100 ml)	0.8	1.7	1.6
Sodio (mg/100ml)	60	430	440
Magnesio (mg/100ml)	10.1	11.4	11.3
Potasio (mg/100ml)	239.4	324.0	162.5
Calcio (mg/100 ml)	55	56	50
Fósforo (mg/100ml)	<100	<100	<100
pH	6.34	6.38	6.43
Ácido láctico (g/100ml)	0.05	0.04	0.22

Los gránulos de kefir fueron cultivados en concentración 10 % p/v en los distintos sueros durante 20 subcultivos cada 24 h a 20 °C. El crecimiento de los gránulos en suero vacuno en polvo reconstituido fue  $0.076 \pm 0.04$ , en suero vacuno líquido  $0.068 \pm 0.05$  y en suero ovino líquido  $0.056 \pm 0.03$ . Estos valores no fueron significativamente diferentes ( $\alpha=0,05$ ). Tampoco se observaron cambios en el aspecto macroscópico de los gránulos que mantuvieron su integridad a lo largo de sucesivos cultivos en los tres sueros analizados (Figura 1.15).



La composición microbiológica en los 3 sueros fermentados con gránulos de kefir tampoco resultó significativamente diferente ( $P > 0.05$ ). El promedio de la concentración de bacterias ácido lácticas fue  $1.0$  a  $1.2 \times 10^7$  UFC/ml y el de levaduras de  $2.0$  a  $4.2 \times 10^6$  UFC/ml (Tabla 1.10).

**Tabla 1.10:** Composición microbiológica de distintos sueros fermentados con gránulos de kefir 10 % p/v durante 24 h a 20 °C.

Suero	BAL (UFC/ml)	Levaduras (UFC/ml)
Bovino en polvo	$1.0 \pm 0.6 \times 10^7$ <sup>a1</sup>	$4.2 \pm 1.5 \times 10^6$ <sup>a</sup>
Bovino líquido	$1.0 \pm 0.3 \times 10^7$ <sup>a</sup>	$2.0 \pm 1.4 \times 10^6$ <sup>a</sup>
Ovino líquido	$1.2 \pm 0.4 \times 10^7$ <sup>a</sup>	$2.7 \pm 1.6 \times 10^6$ <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Dentro de la misma columna letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) evaluadas mediante test T de student.

La composición química de los sueros fermentados fue similar a la de los sueros empleados como sustratos, excepto en el contenido de lactosa y de ácido láctico (Tabla 1.9 vs. Tabla 1.11).

Durante la fermentación el contenido de lactosa en todos los sueros disminuyó 40 a 50 % respecto al inicial, mientras que el ácido láctico alcanzó una concentración promedio en el producto de 0.9 a 1.2 % (Tabla 1.11).

**Tabla 1.11:** Composición química de distintos sueros fermentados con 10 % p/v de gránulos de kefir durante 24 h a 20 °C.

	Bovino en polvo	Bovino líquido	Ovino líquido
Proteínas (g/100g)	0.93 ± 0.06	1.35 ± 0.07	1.25 ± 0.49
Lípidos (g/100ml)	<0.3	0.4	0.4
Lactosa (g/100g)	3.36 ± 0.92	3.81 ± 1.26	2.71 ± 0.45
Humedad (g/100ml)	93.23 ± 1.01	89.5 ± 0.14	91.65 ± 0.21
Cenizas (g/100 ml)	0.69 ± 0.02	1.85 ± 0.07	1.65 ± 0.07
Sodio (mg/100ml)	50 ± 10	440 ± 20	460 ± 10
Magnesio (mg/100ml)	8.8 ± 2.4	10.4 ± 1.6	10.6 ± 1.7
Potasio (mg/100ml)	220.1 ± 8.6	290.5 ± 6.8	159.0 ± 16.8
Calcio (mg/100ml)	48.0 ± 9.0	57.9 ± 2.3	55.4 ± 1.7
Fósforo (mg/100ml)	<100	<100	<100
pH	3.65 ± 0.09	3.54 ± 0.06	3.39 ± 0.04
Ácido láctico (g/100ml)	0.90 ± 0.03	0.99 ± 0.04	1.20 ± 0.05

Los resultados obtenidos indican que los gránulos de kefir se preservan como *starters* y que la composición microbiológica de los productos y las variaciones en la composición química del suero durante la fermentación son similares al utilizar distintos sueros como sustrato.

### 2.3 Fermentación de suero a distintas temperaturas

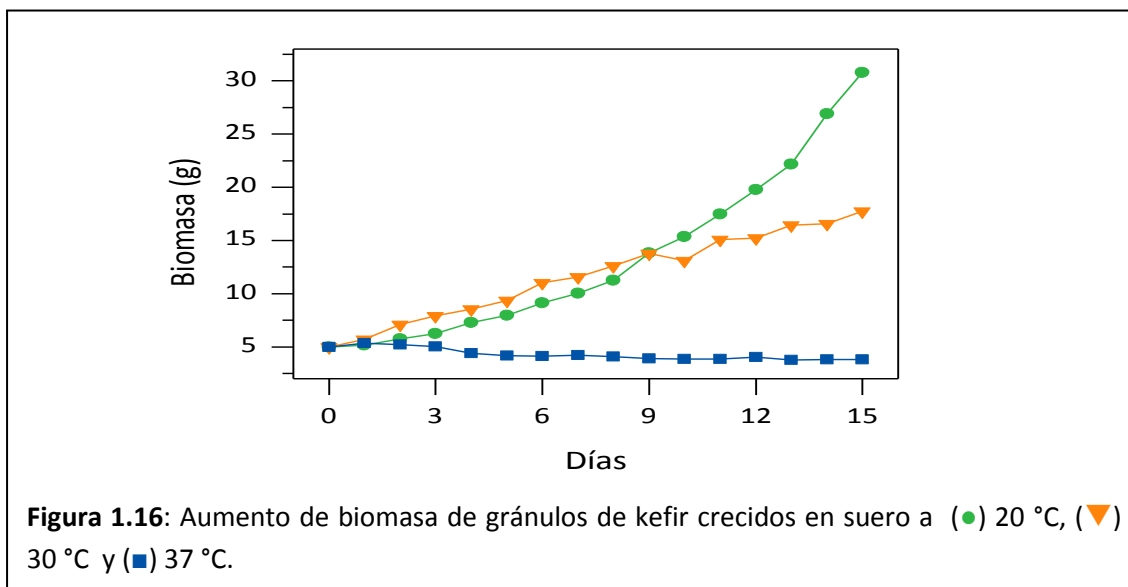
La temperatura de fermentación es una variable a tener en cuenta ya que influye en la velocidad de elaboración de un producto fermentado.

La mayor parte de los microorganismos del kefir son mesófilos, por lo que el kefir se elabora convencionalmente a temperatura ambiente, generalmente entre 20 y 25 °C. Publicaciones previas indican que a temperaturas más altas de fermentación hay un mayor aumento de biomasa de los gránulos de kefir, la producción de etanol comienza con anterioridad (Zajsek y Gorsek, 2010), se acelera la velocidad de fermentación, hay mayor consumo de lactosa (Golfinopoulos y col., 2011) y varían la producción de exopolisacárido y las características reológicas del kefir (Rimada y Abraham, 2001; Bensmira y col., 2010). De acuerdo con estos estudios, distintas temperaturas podrían emplearse según el producto que se desee obtener. Sin embargo, existen escasos antecedentes sobre el efecto de la temperatura en la

integridad de los gránulos de kefir y la composición microbiológica de los mismos y del producto fermentado.

### 2.3.1 Gránulos de kefir en suero a distintas temperaturas

En una primera etapa se evaluó el aspecto macroscópico, la composición química y microbiológica de los gránulos de kefir luego de 20 subcultivos en suero a distintas temperaturas. Como se indicó en la sección 1.1 cuando los gránulos de kefir se emplearon en sucesivas fermentaciones de suero a 20 °C conservaron su composición microbiológica, capacidad de crecimiento y apariencia comparados con los gránulos de kefir originales provenientes de leche.



Cuando la fermentación se llevó a cabo a 30 °C el crecimiento fue similar durante las primeras fermentaciones, sin embargo luego de 9 cultivos en suero a 30 °C los gránulos presentaron un crecimiento escaso e inconstante (Figura 1.16), el crecimiento promedio en 20 mediciones resultó de  $0.069 \pm 0.07$  g/g. En concordancia con estos valores, Rimada y Abraham (2001) hallaron en suero desproteínizado un incremento de biomasa de los gránulos a 30 °C de  $0.05 \pm 0.02$  g/g. Zajsek y Gorsek (2010) informaron que el crecimiento de los gránulos de kefir en leche se incrementaba linealmente al aumentar la temperatura de fermentación de 15 a 31 °C. De acuerdo a los resultados del presente estudio no es posible obtener un aumento constante de la biomasa en el tiempo a 30 °C en suero.

Asimismo se observó un cambio en el aspecto de los gránulos crecidos a esta temperatura, los mismos presentaron aspecto menos granuloso, consistencia menos compacta y fueron más adhesivos que los gránulos crecidos a 20 °C (Figura 1.17). Los gránulos de kefir crecidos a 30 °C presentaron además un contenido de humedad significativamente menor y mayor cantidad de proteínas en relación a los polisacáridos en la matriz del gránulo respecto a los cultivados a 20 °C (Tabla 1.12).



**Figura 1.17:** Apariencia de los gránulos de kefir luego de ser incubados durante 20 días a distintas temperaturas. De izquierda a derecha: 20 °C, 30 °C y 37 °C.

A 37 °C los gránulos fueron incapaces de aumentar su biomasa al subcultivarse cada 24 h por períodos prolongados en suero (Figura 1.16) resultando la tasa de crecimiento negativa ( $-0.017 \pm 0.047$  g/g). En concordancia con estos resultados Rimada y Abraham (2001) hallaron que los gránulos de kefir disminuyen su biomasa 0.03 g/g en 5 h y 30 min en suero de leche desproteínizado a 37 °C. Los gránulos presentaron coloración amarillenta, un granulado de menor tamaño y fueron más compactos que aquellos crecidos a 20 °C (Figura 1.17). Al igual que en la incubación a 30 °C, la matriz de los gránulos crecidos a 37 °C presentó un menor contenido de humedad y mayor relación proteínas/polisacáridos que la de aquellos crecidos a 20 °C (Tabla 1.12). La desintegración de los gránulos podría deberse a una modificación del crecimiento o viabilidad de los microorganismos por la temperatura. Asimismo podría verse afectada la actividad metabólica de algunos microorganismos responsables de la secreción de la matriz del gránulo.



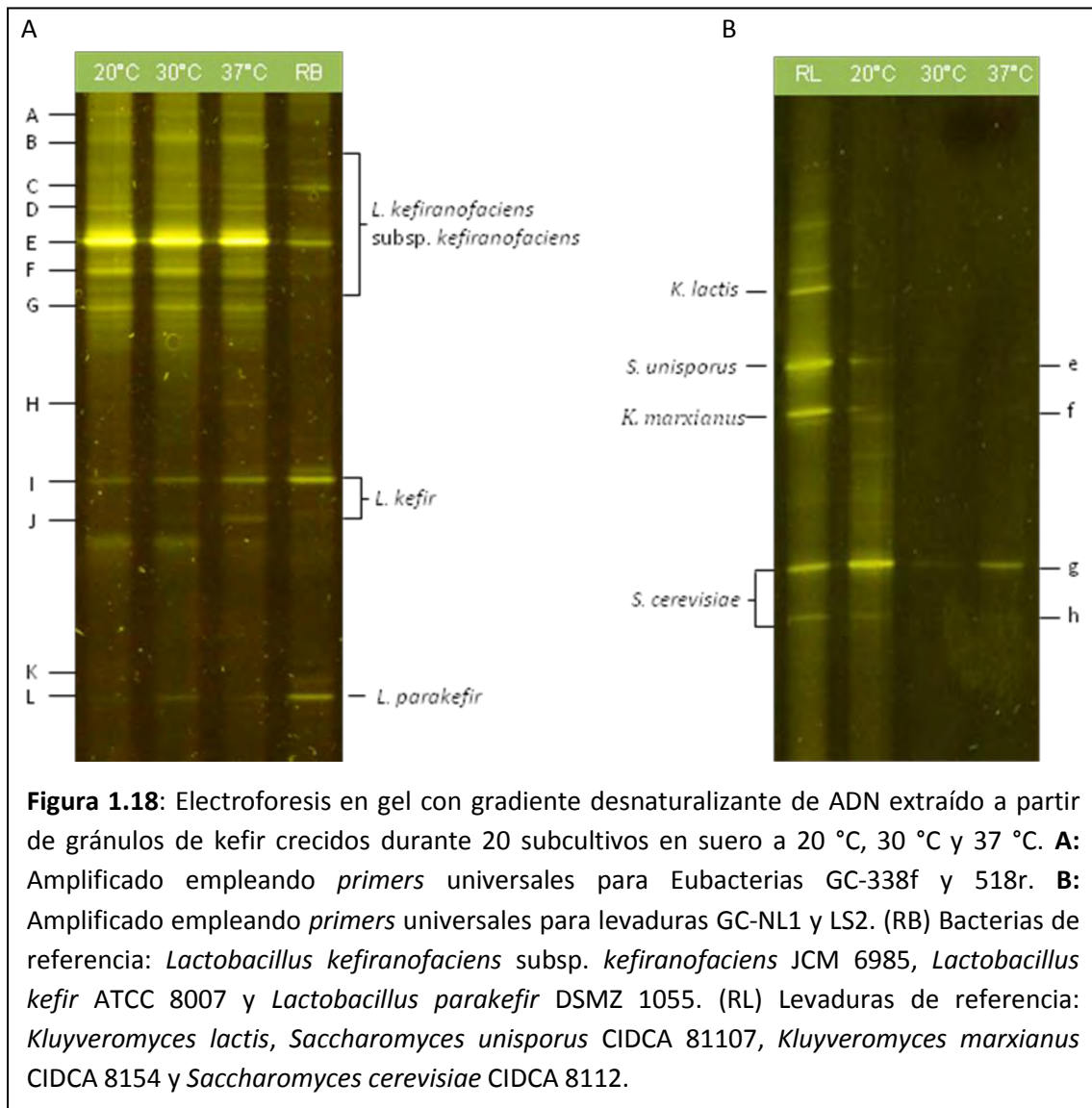
**Tabla 1.12:** Composición microbiológica, contenido de humedad y relación proteínas/polisacáridos de gránulos de kefir crecidos en suero a distintas temperaturas de incubación.

	BAL (UFC/g)	Levaduras (UFC/g)	Humedad (g/kg)	Proteínas/ polisacáridos
20 °C	$6.0 \pm 3.1 \times 10^7$ <sup>a*</sup>	$8.2 \pm 3.9 \times 10^7$ <sup>a</sup>	$805 \pm 5$ <sup>a</sup>	0.60 <sup>a</sup>
30 °C	$1.3 \pm 0.5 \times 10^8$ <sup>a,b</sup>	$7.5 \pm 5.3 \times 10^7$ <sup>a,b</sup>	$716 \pm 18$ <sup>b</sup>	1.01 <sup>b</sup>
37 °C	$2.1 \pm 0.7 \times 10^8$ <sup>b</sup>	$7.4 \pm 6.8 \times 10^6$ <sup>b</sup>	$703 \pm 9$ <sup>b</sup>	0.86 <sup>c</sup>

\*Dentro de la misma columna letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) evaluadas mediante test T de student.

La concentración de bacterias ácido lácticas y levaduras de los gránulos de kefir crecidos en suero a 30 °C no varió significativamente respecto a la de aquellos crecidos a 20 °C (Tabla 1.12). A 37 °C los gránulos presentaron una concentración de bacterias ácido lácticas significativamente mayor y de levaduras significativamente menor ( $P<0.05$ ) que a 20 °C (Tabla 1.12). En concordancia con este resultado Zajsek y Gorsek (2010) describieron que las levaduras presentes en los gránulos de kefir disminuían progresivamente a cuando los mismos se incubaban en leche a temperaturas mayores a 25 °C.

Cuando se compararon los gránulos crecidos a distintas temperaturas por DGGE no se observaron diferencias en los perfiles de bacterias (Figura 1.18 A). Sin embargo la banda d cuya secuencia alineó con *Kaz. unispora*, *Kaz. servazzii* y *Kaz. aquatica* y banda f que alineó con *K. marxianus* estuvieron ausentes en los gránulos crecidos a 30 °C y 37 °C (Figura 1.18 B). Esto indica que hubo una reducción de la diversidad de levaduras al aumentar la temperatura de incubación.



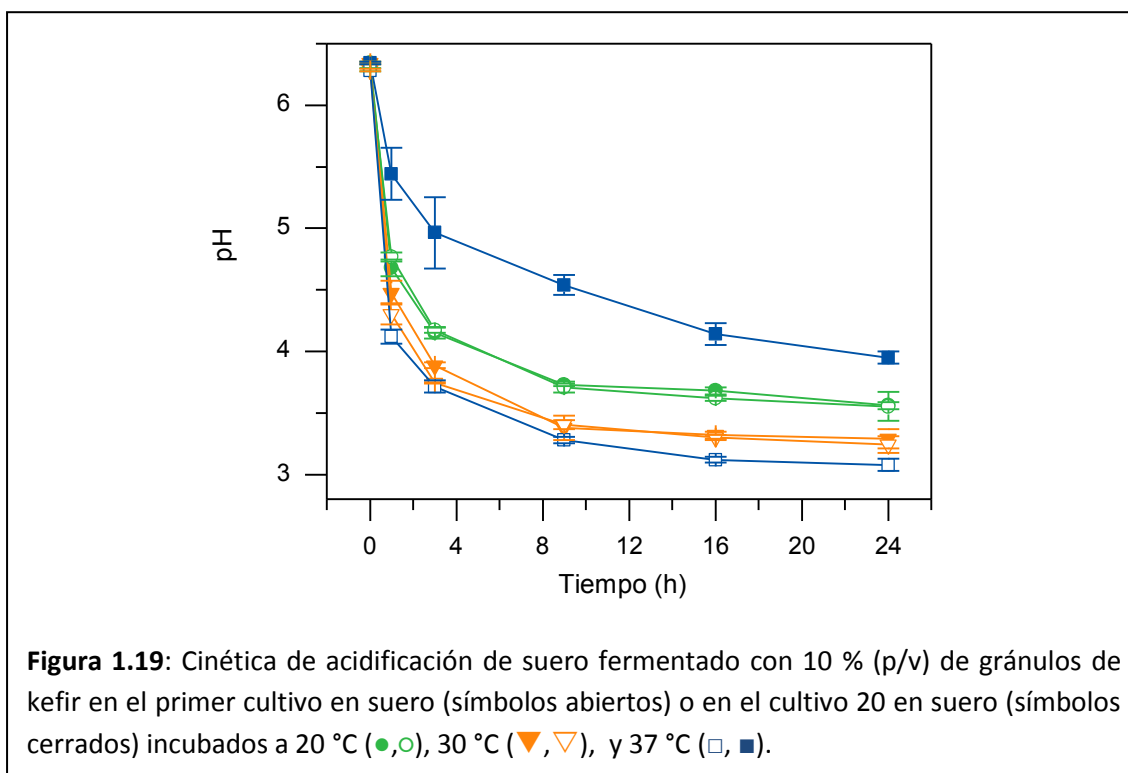
**Figura 1.18:** Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante de ADN extraído a partir de gránulos de kefir crecidos durante 20 subcultivos en suero a 20 °C, 30 °C y 37 °C. **A:** Amplificado empleando *primers* universales para Eubacterias GC-338f y 518r. **B:** Amplificado empleando *primers* universales para levaduras GC-NL1 y LS2. (RB) Bacterias de referencia: *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985, *Lactobacillus kefir* ATCC 8007 y *Lactobacillus parakefir* DSMZ 1055. (RL) Levaduras de referencia: *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces unisporus* CIDCA 81107, *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 y *Saccharomyces cerevisiae* CIDCA 8112.

Los resultados indican que al aumentar la temperatura de incubación de 20 °C a 30 y 37 °C los gránulos no aumentan su biomasa, presentan modificaciones en su aspecto, en la composición química de su matriz y ocurre un desbalance en la composición microbiológica. De manera que para preservar la integridad de los gránulos subcultivados cada 24 h en suero es conveniente emplear una temperatura de incubación de 20 °C.

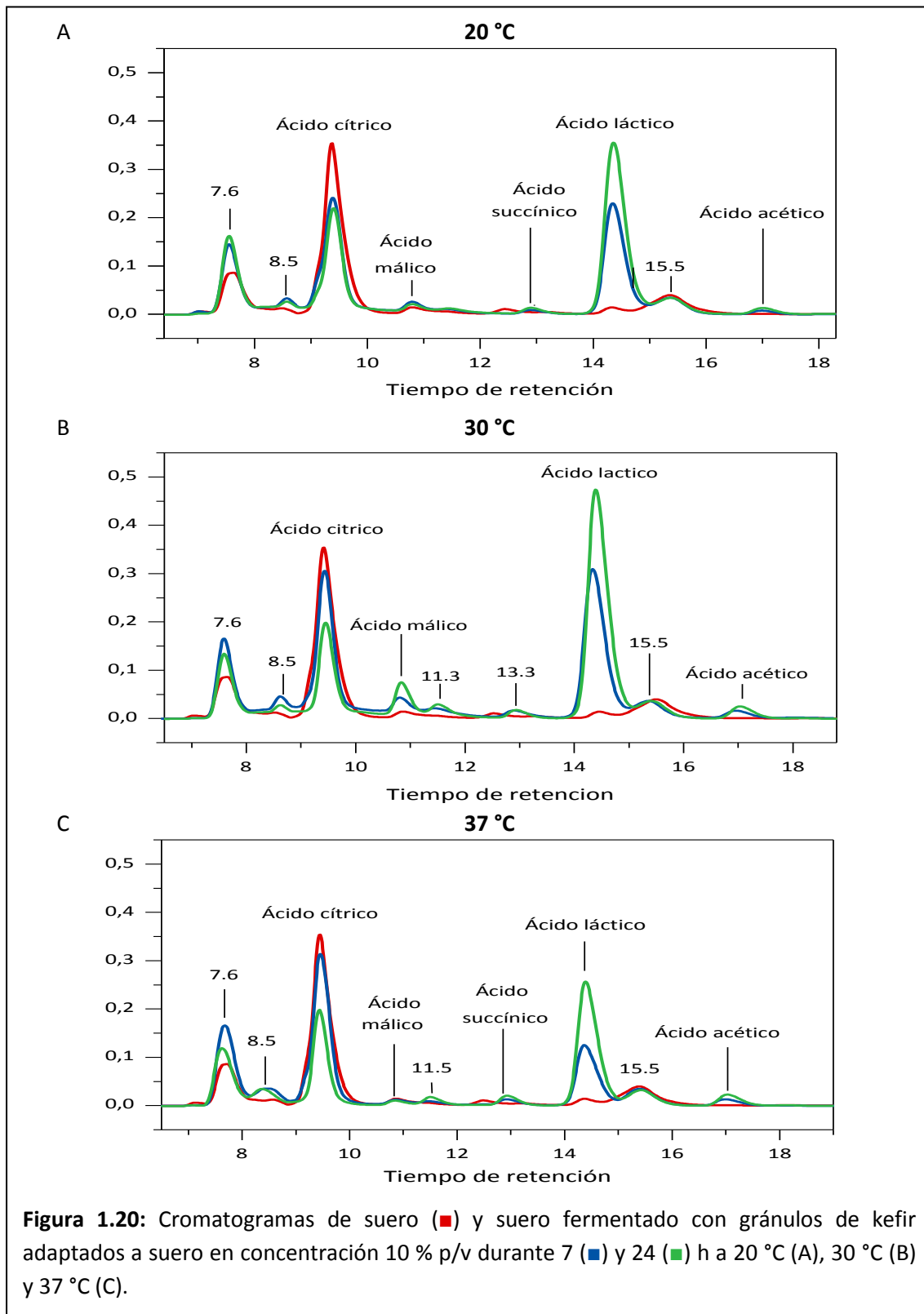
### 2.3.2 Caracterización de suero fermentado con gránulos de kefir a diferentes temperaturas.

Se realizaron cinéticas de acidificación empleando gránulos adaptados a suero durante 20 subcultivos a cada una de las temperaturas ensayadas (20 °C, 30 °C y 37 °C) y gránulos crecidos previamente en leche a 20 °C.

Cuando gránulos de kefir previamente crecidos en leche se utilizaron para fermentar suero se observó un aumento de la velocidad de acidificación con la temperatura (Figura 1.19). Cuando se utilizaron los gránulos después de 20 subcultivos en suero a las diferentes temperaturas, las cinéticas de acidificación no variaron a 20 °C y 30 °C, pero a 37 °C la capacidad de acidificación se vio notoriamente reducida (Figura 1.19). Los productos obtenidos empleando gránulos luego de 20 subcultivos en suero presentaron pH 3.3 a 30 °C, 3.6 a 20 °C y 3.9 a 37 °C. Este resultado se encuentra en concordancia con las modificaciones en el aspecto, crecimiento, composición química y composición microbiológica halladas en los gránulos crecidos a 37 °C.

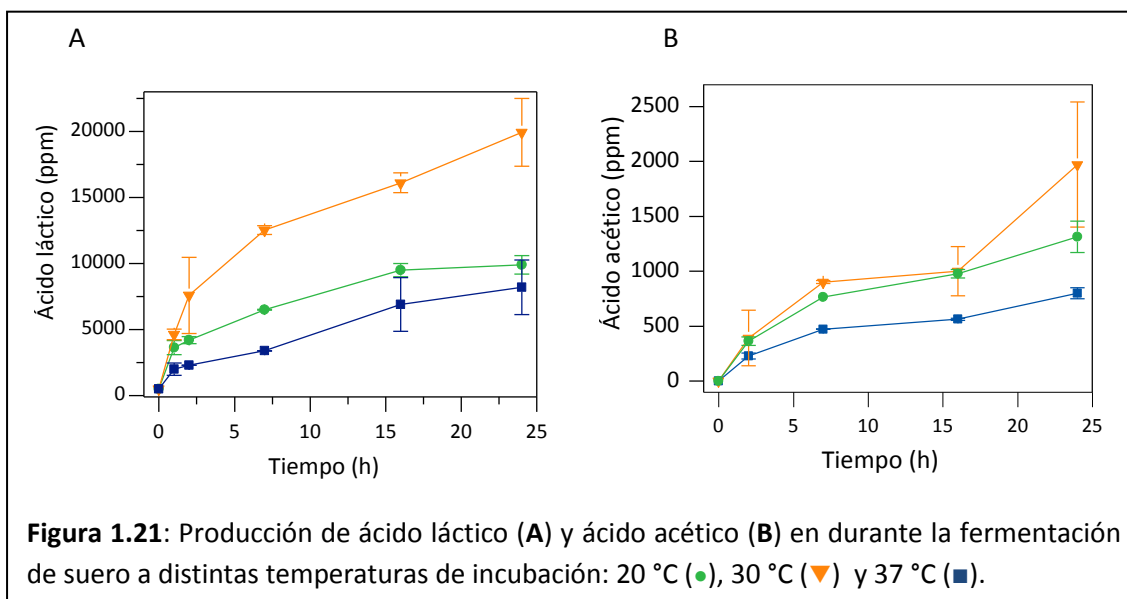


La composición de ácidos orgánicos a lo largo de la fermentación de suero a distintas temperaturas se analizó mediante HPLC de intercambio iónico.



A todas las temperaturas hubo un descenso de la concentración de ácido cítrico y un aumento de la concentración de ácidos láctico, acético y succínico. A 30 °C hubo además una notable producción de ácido málico. Asimismo se observó en todos los cromatogramas un aumento del área bajo los picos a tiempos de retención 7.6 y 8.5 que no pudieron ser identificados (Figura 1.20).

La concentración de ácido láctico y acético en suero a lo largo de la fermentación se calculó mediante curvas de calibración con concentraciones de ácidos conocidas. En concordancia con las cinéticas de acidificación obtenidas luego de 20 subcultivos en suero, la producción de ácido láctico durante la fermentación fue mayor a 30 °C que a 20 °C desde las primeras horas de incubación, mientras que a 37 °C fue aún menor que a 20 °C (Figura 1.21 A). Por otra parte, la producción de ácido acético fue similar a 30 °C y 37 °C y mayor que a 20 °C (Figura 1.21 B). En 24 horas de incubación los niveles de ácido láctico y acético fueron respectivamente 0.90 % y 0.08 % en suero fermentado a 20 °C, 1.99 % y 0.19 % a 30 °C y 0.82 % y 0.16 % a 37 °C.

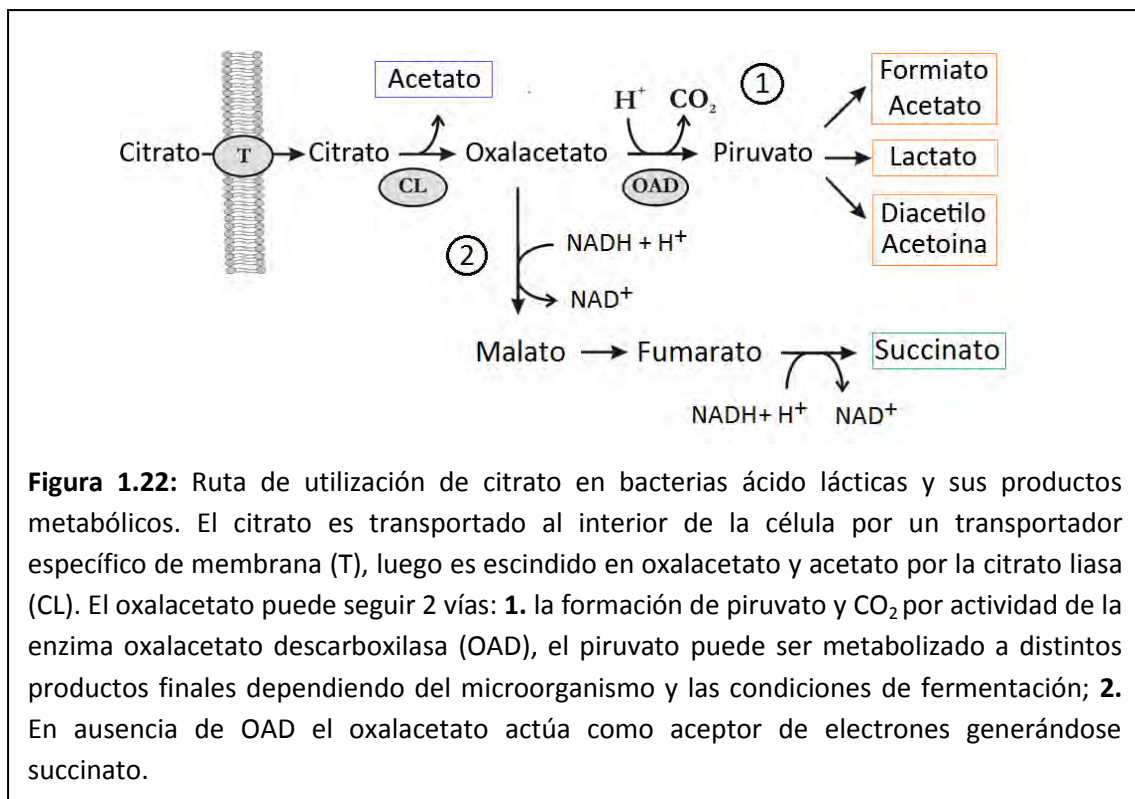


Las BAL fermentan azúcares principalmente mediante 2 rutas. La vía de Embden-Meyerhof-Parnas que conduce casi exclusivamente a la producción de ácido láctico, conociéndose este metabolismo como fermentación homoláctica. Y la vía de las pentosas fosfato que conduce a la generación de cantidades significativas de otros productos finales tales como etanol,

acetato y  $\text{CO}_2$  además de ácido láctico y es conocida con fermentación heteroláctica (Axelsson, 2004). El kefir presenta en su composición BAL tanto homo como heterofermentativas, que explican la producción de ácido láctico y acético durante la fermentación del suero con gránulos de kefir.

Si bien estas vías son las más frecuentes, diferentes condiciones de crecimiento pueden afectar significativamente los productos finales formados por las BAL fundamentalmente debido al desvío del piruvato hacia rutas metabólicas alternativas y/o al uso de aceptores externos de electrones.

La presencia de citrato en el suero puede incidir en la formación de productos metabólicos distintos a los ácidos láctico y acético durante la fermentación. El citrato puede ser metabolizado por algunas BAL, su metabolismo se ha estudiado en mayor detalle para *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuconostoc* sp. y *Weissella* sp. que son empleadas para la síntesis de compuestos aromáticos en la industria láctea (García Quintans y col., 2008). Sin embargo también se ha descrito para especies del género *Lactobacillus* tales como *L. casei*, *L. plantarum*, *L. viridescens*, *L. paracasei*, *L. zae* y *L. rhamnosus* (Skeie y col., 2008).

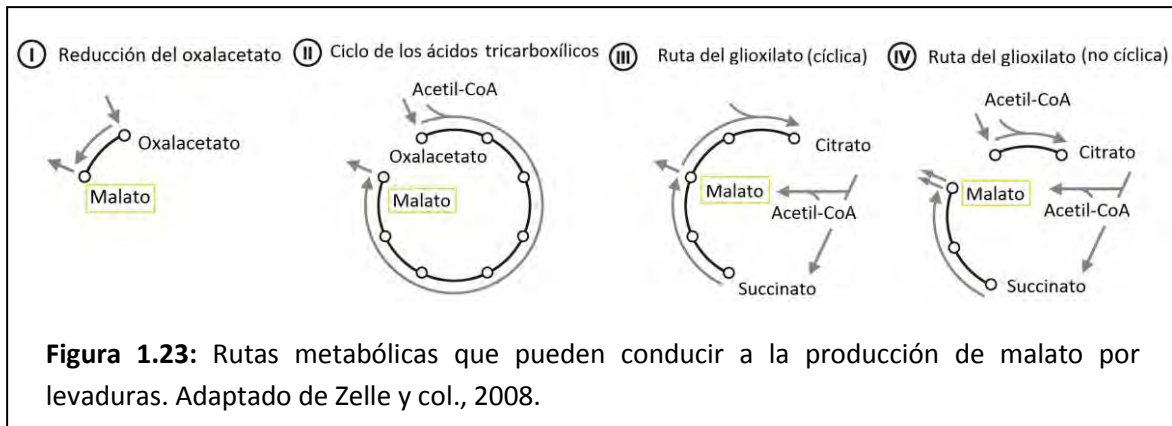


**Figura 1.22:** Ruta de utilización de citrato en bacterias ácido lácticas y sus productos metabólicos. El citrato es transportado al interior de la célula por un transportador específico de membrana (T), luego es escindido en oxalacetato y acetato por la citrato liasa (CL). El oxalacetato puede seguir 2 vías: **1.** la formación de piruvato y  $\text{CO}_2$  por actividad de la enzima oxalacetato descarboxilasa (OAD), el piruvato puede ser metabolizado a distintos productos finales dependiendo del microorganismo y las condiciones de fermentación; **2.** En ausencia de OAD el oxalacetato actúa como aceptor de electrones generándose succinato.

El citrato es transportado al interior de las células y luego es escindido a acetato y oxalacetato por la enzima citrato liasa. Si la bacteria presenta la enzima oxalacetato descarboxilasa, el oxalacetato puede ser convertido a piruvato. El exceso de piruvato generado puede seguir rutas que conducen a la producción de diacetilo, acetoína, formiato y acetato dependiendo de la bacteria y las condiciones de crecimiento (Figura 1.22, vía indicada como 1). En ausencia de la enzima oxalacetato descarboxilasa el oxalacetato actúa como aceptor de electrones transformándose a succinato (Figura 1.22, vía indicada como 2). Esta ruta ha sido descrita para explicar la producción de ácido succínico durante el co-metabolismo de citrato con otros azúcares tales como la lactosa (Axelsson, 2004). Asimismo podría explicar la producción de ácido succínico durante la fermentación de suero observada en el presente estudio.

El metabolismo del ácido cítrico contribuye a mejorar el crecimiento durante su co-metabolismo con otras fuentes de azúcares. Además se ha descrito que tiene un efecto protector contra el estrés ácido, ya que conduce a la alcalinización del citoplasma por el consumo intracelular de protones durante su degradación y del medio externo por la secreción de compuestos menos ácidos resultantes de su catabolismo (García Quintans y col., 2008).

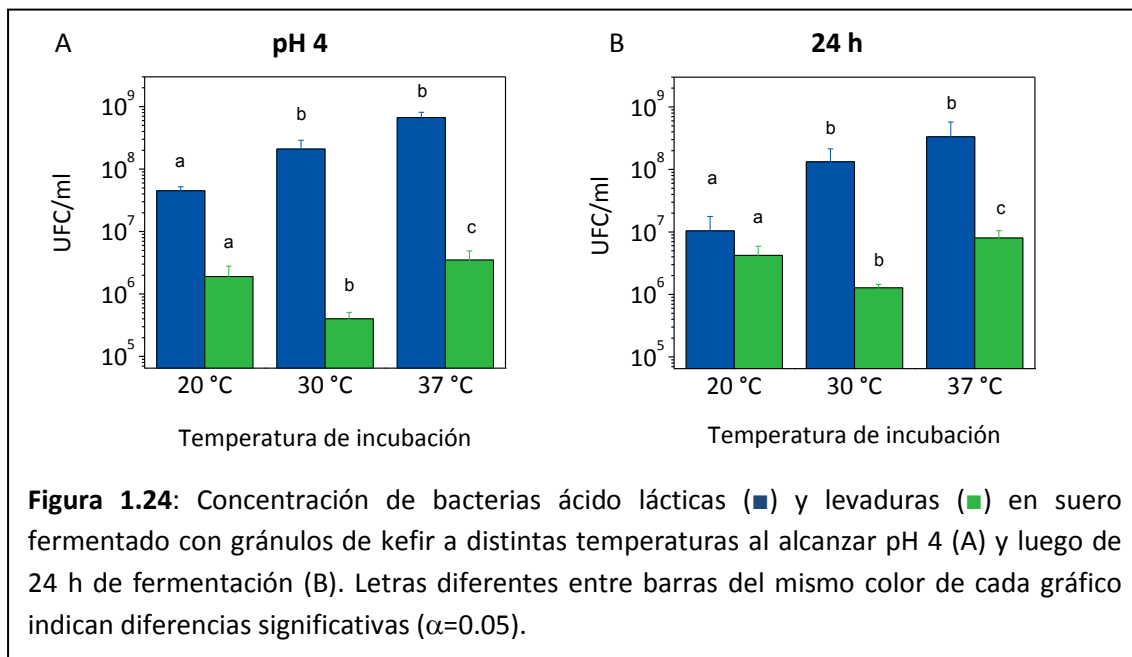
El aumento de ácido málico durante la fermentación de suero, observado fundamentalmente a 30 °C, podría asociarse al metabolismo de levaduras. Algunas levaduras, tales como *Zygosaccharomyces rouxii* (Taing y Taing, 2007) y *Saccharomyces cerevisiae* (Schwartz y Radler, 1988; Pines y col., 1996, 1997; Zelle y col., 2008) son capaces de producir ácido málico. Se ha descrito que la producción puede ocurrir por 4 vías: i) por reducción de oxalacetato a malato, ii) por condensación de oxalacetato con acetyl-CoA para formar ácido cítrico seguido por la oxidación a malato a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos, iii) por condensación de 2 moléculas de acetyl-CoA por vía cíclica a través del ciclo del glioxilato, o iv) utilizando enzimas del glioxilato a través de una vía no cíclica en la cual el oxalacetato es regenerado por carboxilación del piruvato (Figura 1.23) (Zelle y col., 2008).



La composición microbiológica de los productos fermentados a distintas temperaturas se analizó mediante recuentos de BAL y levaduras viables en placa realizados al momento en que los cultivos alcanzaron pH 4 y a las 24 h de fermentación.

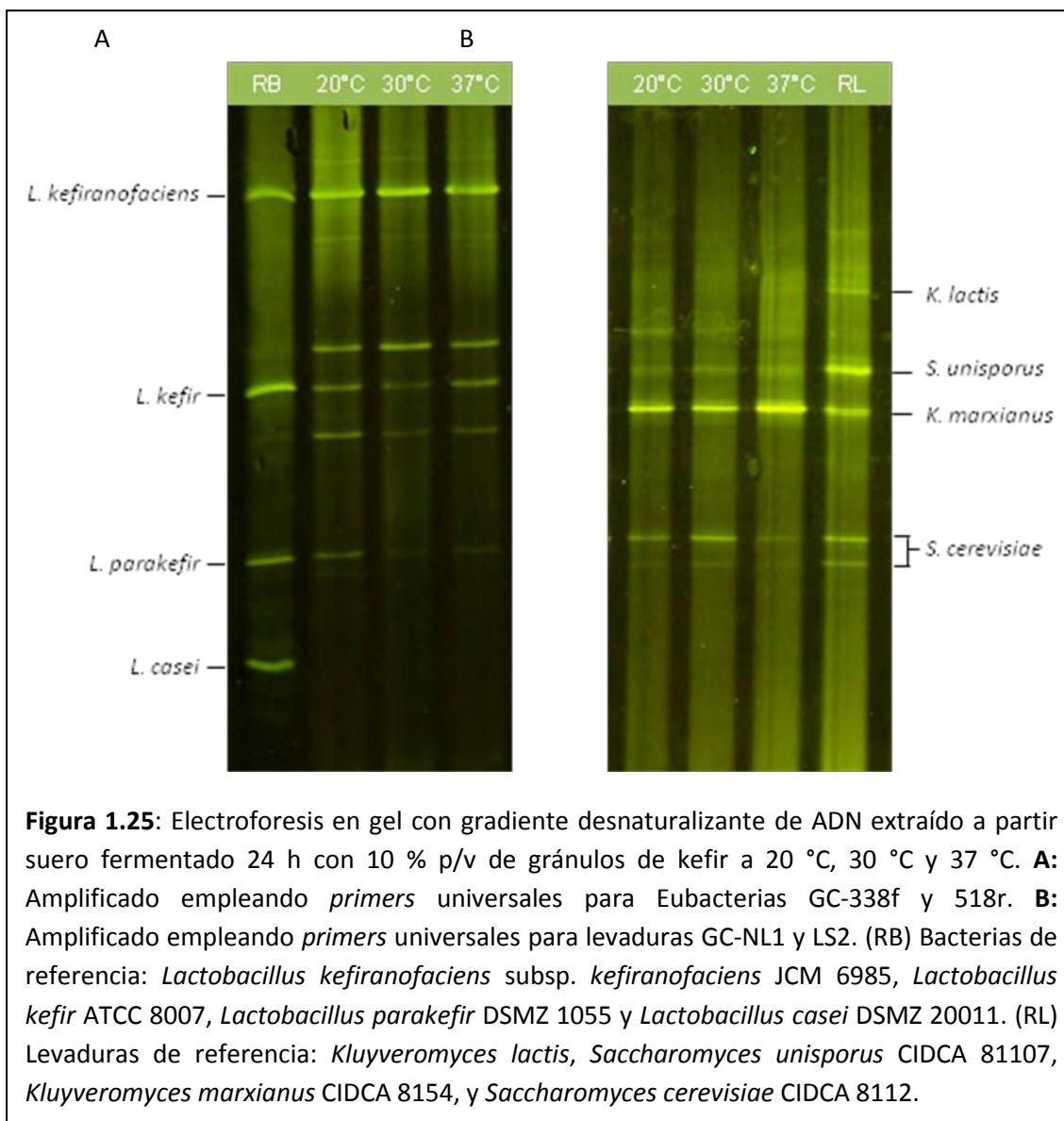
Los productos fermentados alcanzaron pH 4 luego de 2 h a 30 °C, de 4 h a 20 °C y de 16 h a 37 °C. La concentración de microorganismos en los 3 productos a estos tiempos fue semejante a la obtenida luego de 24 h de fermentación (Figura 1.24 A vs. B).

El suero fermentado a 30 °C y 37 °C presentó significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) contenido de bacterias ácido lácticas que el suero fermentado a 20 °C. El contenido de levaduras fue significativamente diferente ( $P > 0.05$ ) entre las 3 temperaturas de fermentación. Puede notarse que a temperaturas elevadas hay un desbalance de la microbiota aumentando la relación BAL/levaduras.





Las diferencias halladas en los recuentos no se vieron reflejadas en los perfiles DGGE que resultaron idénticos a las distintas temperaturas de incubación (Figura 1.25). De manera que la temperatura no afectó la composición de especies presentes en el producto pero si la concentración de microorganismos viables.



Tal como indican las cinéticas de pH realizadas con gránulos provenientes de leche es posible aumentar la velocidad de fermentación empleando mayores temperaturas de incubación. Sin embargo los gránulos se alteran luego de sucesivas fermentación cada 24 h en suero a 30 y 37 °C, lo cual se refleja en una disminución de la capacidad de acidificación,

diferencias en la composición de ácidos orgánicos y en el balance microbiano de los productos fermentados obtenidos a distintas temperaturas. Dado que el contenido de BAL y levaduras de los productos fue similar a pH 4 que luego de 24 h de fermentación sería interesante evaluar la integridad de los gránulos en fermentaciones sucesivas de suero a altas temperaturas acortando el tiempo de incubación.

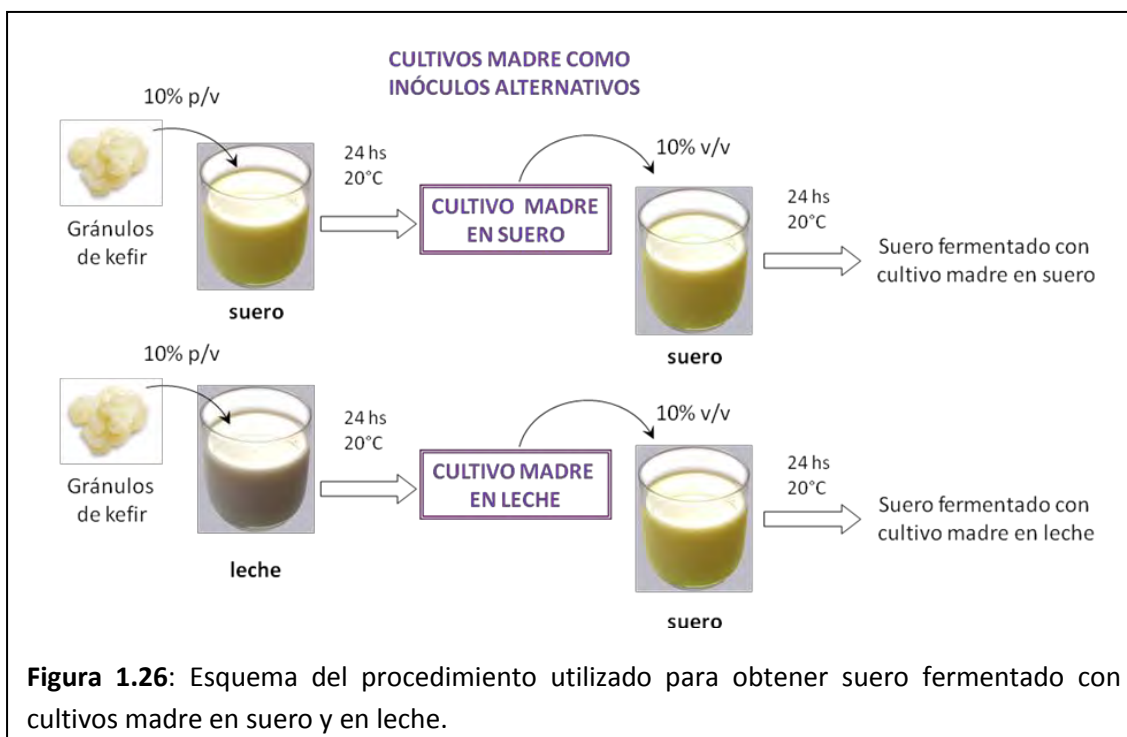
### **3. Fermentación de suero con cultivos iniciadores alternativos**

Uno de los desafíos más importantes en la industrialización del kefir es lograr un producto de calidad satisfactoria y constante, dado que la diversidad microbiana de los gránulos dificulta la obtención de un producto de características homogéneas. Por otra parte, para elaborar kefir a escala industrial se requerirían grandes cantidades de gránulos de kefir y el desarrollo de estrategias para aprovechar el exceso de gránulos que se generaría debido su constante crecimiento. En consecuencia se evaluaron procesos de fermentación de suero empleando, como *starters* alternativos a los gránulos de kefir, cultivos madre y cepas aisladas de kefir.

#### **3.1 Fermentación de suero con cultivos madre en suero y en leche**

Los cultivos madre en suero y en leche se obtuvieron de la fermentación de suero y leche con gránulos de kefir al 10 % p/v durante 24 h a 20 °C. Estos cultivos fueron luego añadidos a suero fresco en concentración 10 % v/v e incubados durante 24 h a 20 °C (Figura 1.26).

Mediante esta técnica se reduce 10 veces la cantidad de gránulos indispensables para lograr la misma cantidad de producto que al emplear directamente gránulos de kefir. Los productos obtenidos fueron caracterizados química y microbiológicamente.



La composición microbiológica de los cultivos madre empleados como *starters* se presenta en la Tabla 1.13. A fines comparativos se incluye también en la tabla la composición microbiológica de los gránulos de kefir. Estos inóculos presentan diferencias no sólo en su contenido de BAL y levaduras viables sino también en sus perfiles DGGE (sección 1.1 Figuras 1.4 y 1.6; sección 1.2 Figura 1.9).

**Tabla 1.13:** Composición microbiológica de los gránulos de kefir y de los cultivos madre en suero y leche empleados como *starters*.

	BAL (UFC/g)	Levaduras (UFC/g)
Gránulos de kefir	$6.0 \pm 3.1 \times 10^7$	$8.3 \pm 3.0 \times 10^7$
Cultivo madre en leche	$3.9 \pm 3.1 \times 10^8$	$8.8 \pm 5.4 \times 10^5$
Cultivo madre en suero	$1.0 \pm 0.7 \times 10^7$	$4.2 \pm 1.7 \times 10^6$

Cuando se emplearon como inóculos cultivos madre obtenidos en suero o en leche se obtuvieron productos con un contenido de BAL significativamente mayor que al emplear gránulos de kefir (Tabla 1.14). El contenido de levaduras fue significativamente ( $P < 0.05$ ) mayor en el suero fermentado con cultivo de suero y menor en aquel fermentado con cultivo de leche respecto al producto obtenido empleando gránulos de kefir (Tabla 1.14).

**Tabla 1.14:** Composición microbiológica de suero fermentado empleado distintos *starters*.

<i>Starter</i>	BAL (UFC/ml)*	Levaduras (UFC/ml)*
Gránulos de kefir (10 % p/v)	$1.0 \pm 0.7 \times 10^7$ <sup>a</sup>	$4.2 \pm 1.7 \times 10^6$ <sup>a</sup>
Cultivo madre en leche (10 % v/v)	$7.7 \pm 1.3 \times 10^8$ <sup>b</sup>	$7.5 \pm 3.0 \times 10^5$ <sup>b</sup>
Cultivo madre en suero (10 % v/v)	$1.5 \pm 0.3 \times 10^8$ <sup>c</sup>	$1.1 \pm 0.5 \times 10^7$ <sup>c</sup>

\*Se presenta el promedio y el desvío estándar de 8 mediciones independientes.

Los productos obtenidos de la fermentación de suero con cultivos madre en leche y suero fueron caracterizados en cuanto a su composición química (Tabla 1.15). El suero fermentado con cultivos madre no presenta una variación significativa en su contenido de proteínas, lípidos, humedad, cenizas ni minerales respecto al suero empleado como sustrato (Tabla 1.15 vs. Tabla 1.9 suero bovino en polvo reconstituido, sección 2.2).

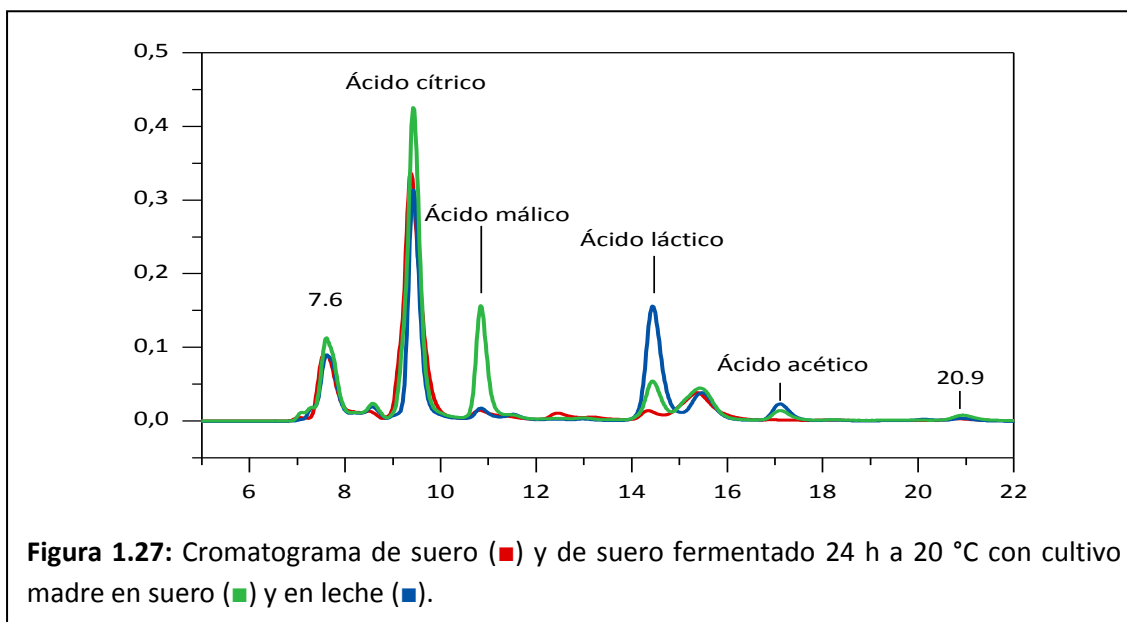
**Tabla 1.15:** Composición química de suero fermentado con cultivos madre en suero y en leche.

	Suero fermentado utilizando como <i>starter</i>	
	Cultivo madre en suero	Cultivo madre en leche
Proteínas (g/100g)	$1.05 \pm 0.07$	$1.25 \pm 0.07$
Lípidos (g/100ml)	<0.3	<0.3
Lactosa (g/100g)	$3.60 \pm 0.99$	$4.5 \pm 1.08$
Humedad (g/100ml)	$91.95 \pm 0.21$	$91.6 \pm 0.14$
Cenizas (g/100 ml)	$0.55 \pm 0.21$	$0.75 \pm 0.07$
Sodio (mg/100ml)	$60 \pm 10$	$50 \pm 10$
Magnesio (mg/100ml)	$9.2 \pm 2.1$	$9.7 \pm 1.4$
Potasio (mg/100ml)	$219.8 \pm 24.4$	$223.6 \pm 15.7$
Calcio (mg/l)	$44.3 \pm 10.6$	$57.1 \pm 1.3$
Fósforo (mg/100ml)	<100	<100
pH	$5.05 \pm 0.35$	$4.46 \pm 0.01$
Ácido láctico (g/100ml)	$0.20 \pm 0.07$	$0.55 \pm 0.02$
Ácido acético (g/100ml)	$0.04 \pm 0.02$	$0.11 \pm 0.01$

El suero fermentado con cultivo de leche presentó menor pH y mayor contenido de ácido láctico y acético que el fermentado con cultivo de suero. Por otro lado, en el cromatograma del producto fermentado con cultivo de suero se observó una notable producción de ácido

málico y, a diferencia de lo hallado en otros sueros fermentados, no se detectó una disminución sino un aumento de la concentración de ácido cítrico (Figura 1.27).

La mayor producción de ácido málico podría deberse a la mayor concentración de levaduras en el suero fermentado con cultivo de suero, dado que como se explicó anteriormente este ácido puede generarse como producto final del metabolismo de algunas levaduras. También el ácido cítrico puede formarse como producto metabólico de levaduras (Grewal y Kalra, 1995; Anastassiadis y col., 2008).



La diferencia entre el perfil de ácidos orgánicos de suero fermentado con gránulos de kefir y con cultivo madre de suero podría deberse a diferencias en la composición de especies de ambos productos. Respecto a esto Simova y col. (2002) describieron variaciones en la composición y estructura cuantitativa de especies presentes en leche fermentada con gránulos de kefir respecto a aquella fermentada con kefir, indicando que ocurre un desbalance en la microbiota. En qué medida la modificación de la composición microbiana, pH y composición de ácidos orgánicos de los productos obtenidos a partir de cultivos madre es favorable o desfavorable deberá ser evaluada de acuerdo con la aplicación que se le otorgue al producto.

### 3.2 Fermentación de suero con microorganismos aislados de kefir

El CIDCA cuenta con una colección de bacterias ácido lácticas y levaduras aisladas de kefir que han sido estudiadas en cuanto a sus características probióticas determinándose su resistencia a bajos pH, tolerancia a la bilis, capacidad de autoagregar y coagregar con otros microorganismos, su adherencia a enterocitos en cultivo, su acción antagónica sobre toxinas y/o microorganismos patógenos y su capacidad inmunomoduladora *in vitro*.

Golowczyc y col. (2008) estudiaron las propiedades superficiales y probióticas de 11 lactobacilos homofermentativos aislados de kefir de la especie *Lactobacillus plantarum*. Entre ellos se seleccionó la cepa CIDCA 8327 por presentar alta tolerancia a la bilis, resistencia a pH ácido (sobrevivida del 42 % a pH 2.5 durante 3 h), alta adhesión a células Caco-2 *in vitro* y capacidad de inhibir el crecimiento de *Salmonella enterica* serovar. Thyphimurium, *S. enterica* serovar. Gallinarum, *S. enterica* serovar. Enteritidis, *Shigella sonnei* y *Escherichia coli*.

Entre los lactobacilos heterofermentativos se seleccionó la cepa de *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 que presenta alta hidrofobicidad, resistencia a la bilis, alta adhesión a células intestinales epiteliales y capacidad de coagregar con *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis (Golowczyc, 2008). Esta cepa posee además capa-S, cuya proteína constituyente es excretada naturalmente al medio de crecimiento y se deposita sobre la superficie de *Salmonella* disminuyendo su capacidad invasiva (Golowczyc y col., 2007).

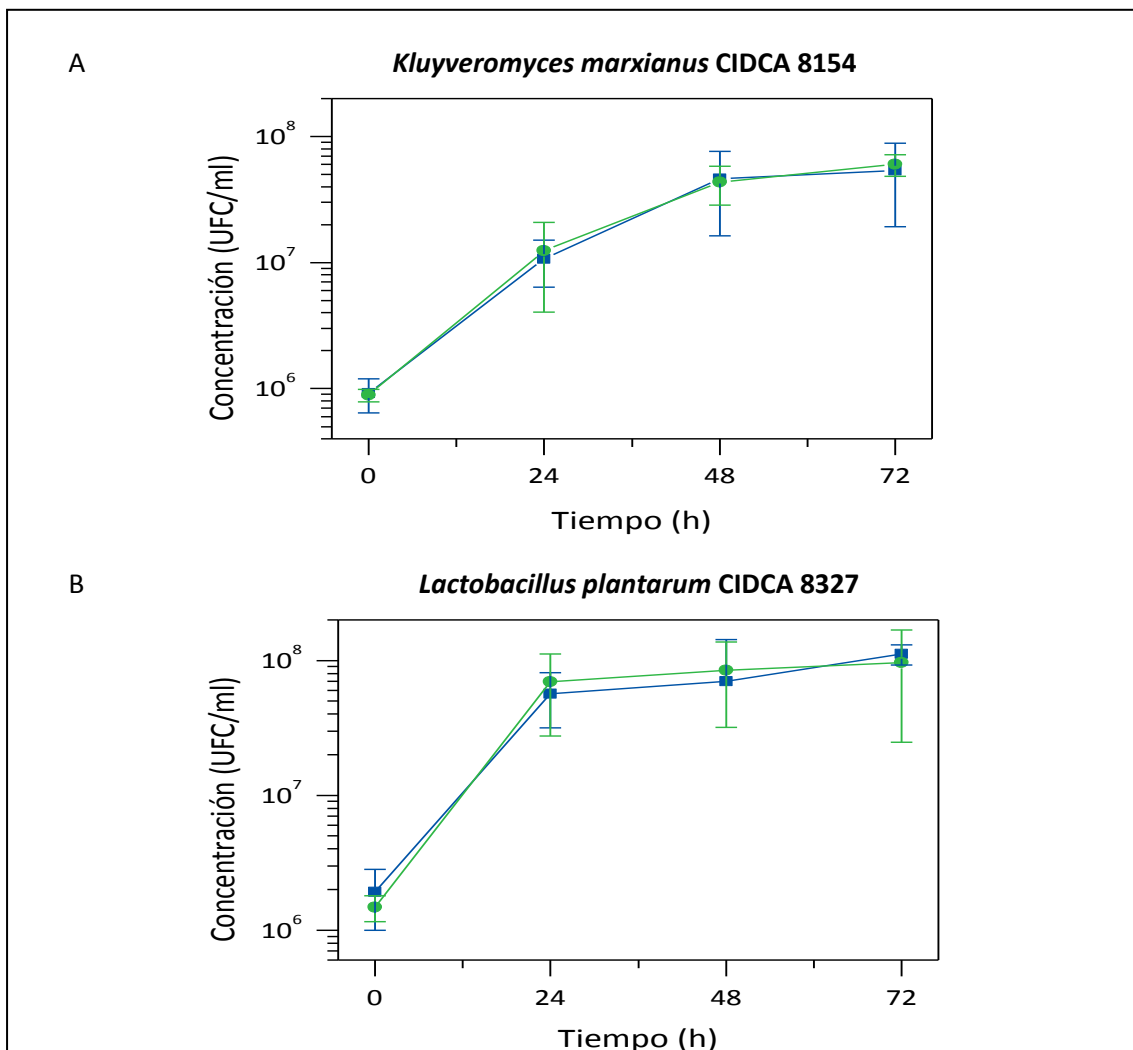
Se escogió también la levadura *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8354 que presenta alta tolerancia a las sales biliares y a la acidez, reduce la acción citotóxica de *Clostridium difficile* (Diosma, 2010) y presenta capacidad inmunomoduladora (Romanin y col., 2010).

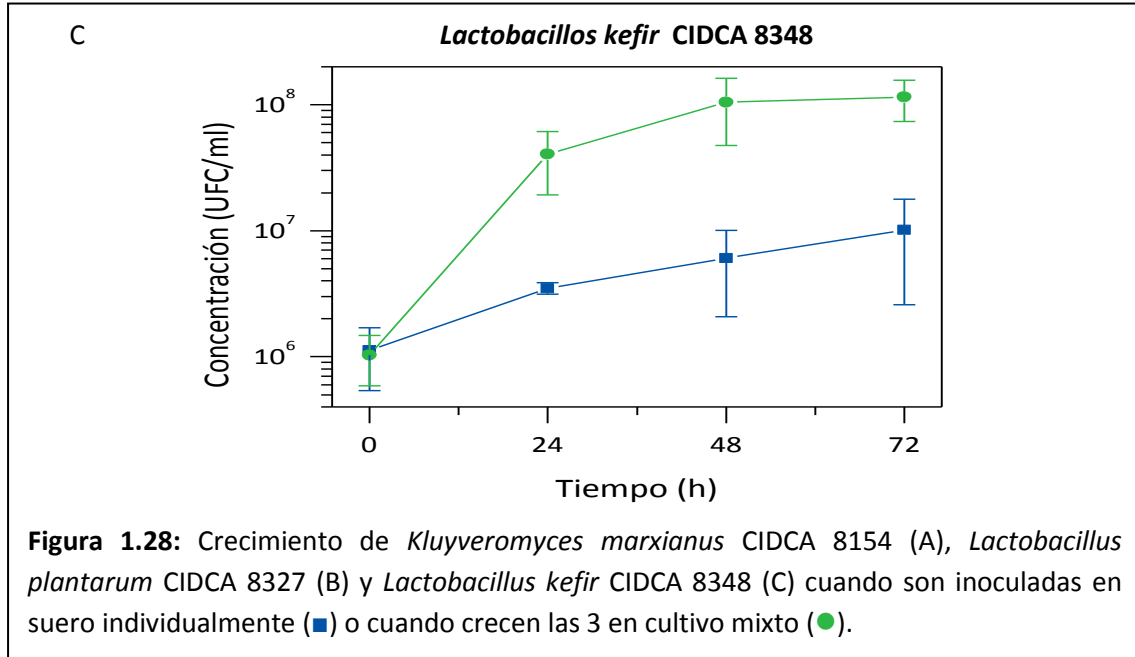
Se evaluó la factibilidad de utilizar suero como sustrato para crecer estas cepas y se caracterizaron los productos fermentados obtenidos.

Las cepas *L. kefir* CIDCA 8348, *L. plantarum* CIDCA 8327 y *K. marxianus* CIDCA 8154 aisladas de kefir se inocularon por separado o las 3 conjuntamente en suero esterilizado por tindalización a una concentración  $10^6$  UFC/ml. Se analizó el crecimiento, la acidificación y la producción de ácidos orgánicos durante 72 h de incubación.

### 3.2.1 Crecimiento de los microorganismos en suero en cultivos puros y mixtos

*K. marxianus* CIDCA 8154 y *L. plantarum* CIDCA 8327 fueron capaces de desarrollar en suero hasta alcanzar una concentración de  $5 \times 10^7$  UFC/ml y  $1 \times 10^8$  UFC/ml respectivamente, mientras que *L. kefir* CIDCA 8348 presentó un crecimiento escaso en este medio, alcanzando concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/ml. Cuando se inocularon las 3 cepas simultáneamente, el crecimiento de *L. plantarum* y *K. marxianus* no se modificó respecto al obtenido con las cepas puras, pero el de *L. kefir* aumentó significativamente, alcanzando una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml en el producto fermentado (Figura 1.28).





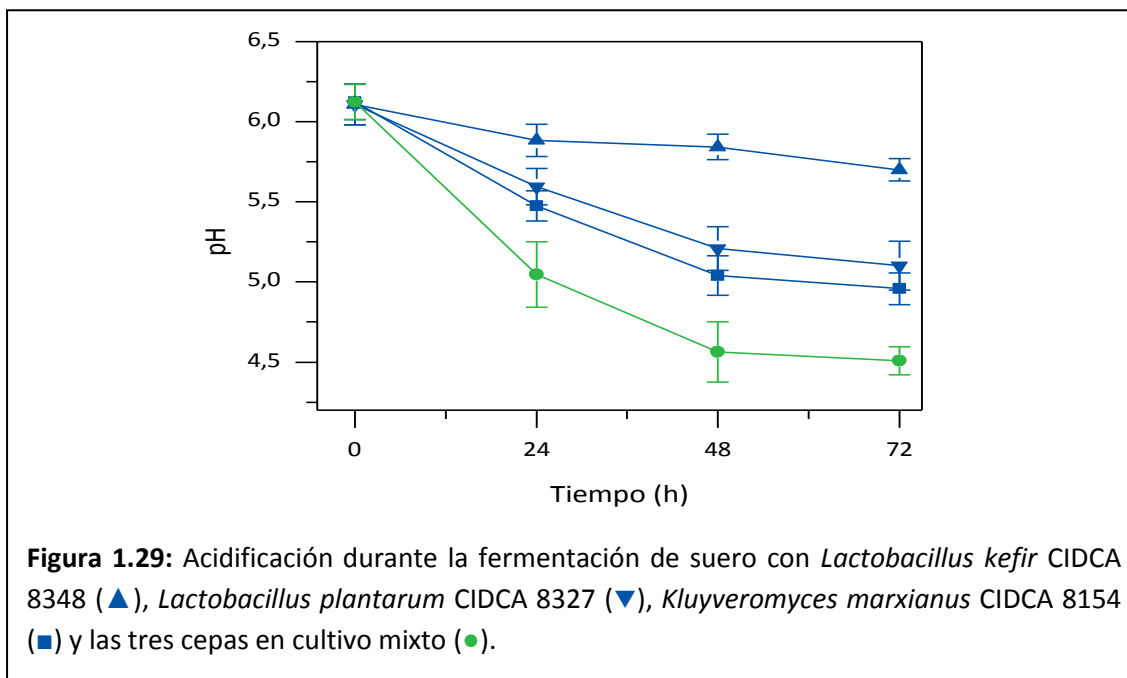
*Lactobacillus kefir* es incapaz de metabolizar la lactosa, el carbohidrato mayoritario del suero, por lo que este efecto sinérgico en el crecimiento podría deberse en parte a la fermentación de lactosa por *K. marxianus*. El metabolismo de lactosa por parte de la levadura permitiría su transformación en otros compuestos orgánicos que puedan ser utilizados como nutrientes por los lactobacilos. Además *K. marxianus* posee capacidad de producir vitaminas que mejoran el crecimiento de los lactobacilos (Lopitz-Otsoa y col., 2006). Es probable que durante la fase estacionaria de crecimiento de *K. marxianus*, después de 48 h de cultivo, se produzca autólisis celular y se liberen al medio factores de crecimiento tales como aminoácidos esenciales y vitaminas, que contribuyan al desarrollo de lactobacilos.

El efecto estimulante de las levaduras sobre el crecimiento de lactobacilos aislados de kefir ha sido informado por otros autores. Echeverría y col. (2007) demostraron que la presencia de *S. cerevisiae* (no fermentadora de lactosa) y de *K. marxianus* (fermentadora de lactosa) o de sus metabolitos estimulan el crecimiento de los lactobacilos e incrementan su capacidad acidificante. Bolla (2011) también describió un mayor crecimiento de *L. plantarum*, *L. kefir* y *Lactococcus lactis* aislados de kefir en cultivos mixtos con levaduras.



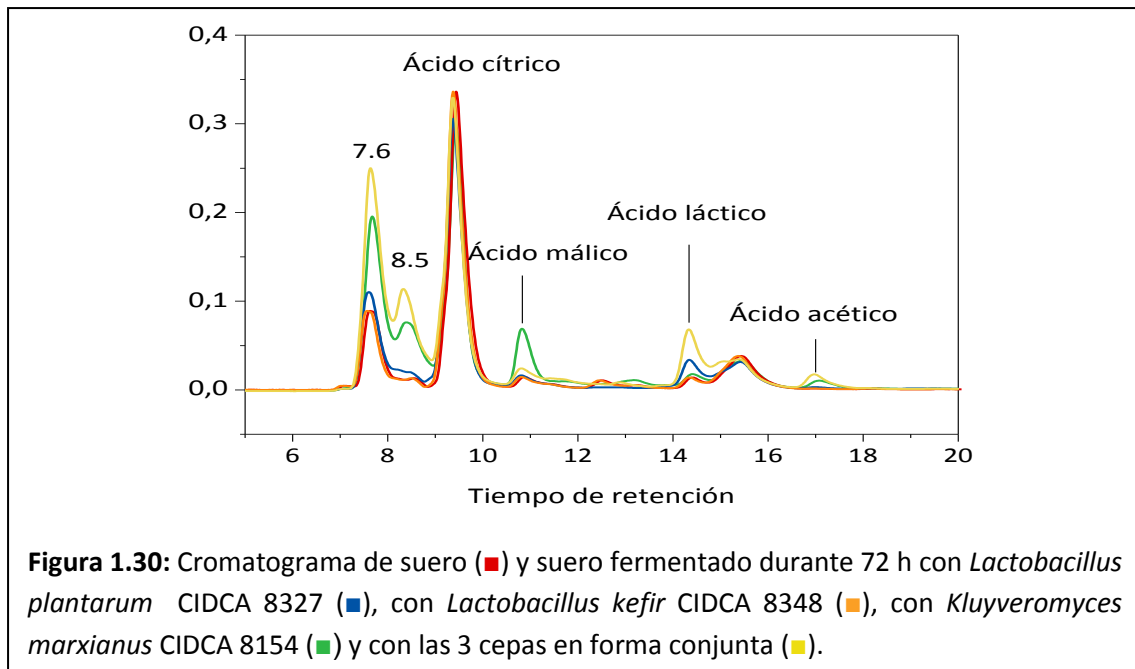
### 3.2.2 Acidificación de suero y producción de ácidos orgánicos

*Lactobacillus kefir* cultivado en forma individual acidificó levemente el suero en 72 h de incubación desde pH 6.2 hasta pH  $5.7 \pm 0.07$ . Mientras que el pH fue menor en los productos obtenidos con *K. marxianus* (pH  $5.0 \pm 0.10$ ) y con *L. plantarum* (pH  $5.1 \pm 0.15$ ). El suero fermentado con las tres cepas conjuntamente presentó un pH de  $4.5 \pm 0.1$  luego de 72 h de incubación (Figura 1.29).



El contenido de orgánicos de los distintos productos fermentados se analizó mediante HPLC de intercambio iónico (Figura 1.30). Pudo observarse que el cromatograma de suero fermentado con *L. kefir* CIDCA 8348 es semejante al del suero sin fermentar, en correspondencia con su escaso crecimiento y acidificación. El principal ácido producido por *L. plantarum* CIDCA 8327 durante la fermentación fue el ácido láctico, siendo este resultado esperable dado que esta especie es homofermentativa facultativa. El suero fermentado con *K. marxianus* CIDCA 8154 presentó ácido málico y ácido acético, así como 2 picos notorios a tiempos de retención 7.6 y 8.5 min que no coincidieron con ninguno de los ácidos incluidos como patrón (oxálico, cítrico, ascórbico, pirúvico, málico, succínico, láctico, fórmico, acético, propiónico y butírico).

En el suero fermentado con las 3 cepas en forma conjunta se observa mayor concentración de ácido láctico y acético que al emplear cepas individuales, probablemente debido al mayor crecimiento de *L. kefir* en el cultivo mixto. En el perfil de este producto también es destacable el aumento de las áreas bajo los picos a tiempos de retención 7.6 y 8.5 min que no pudieron ser identificados.



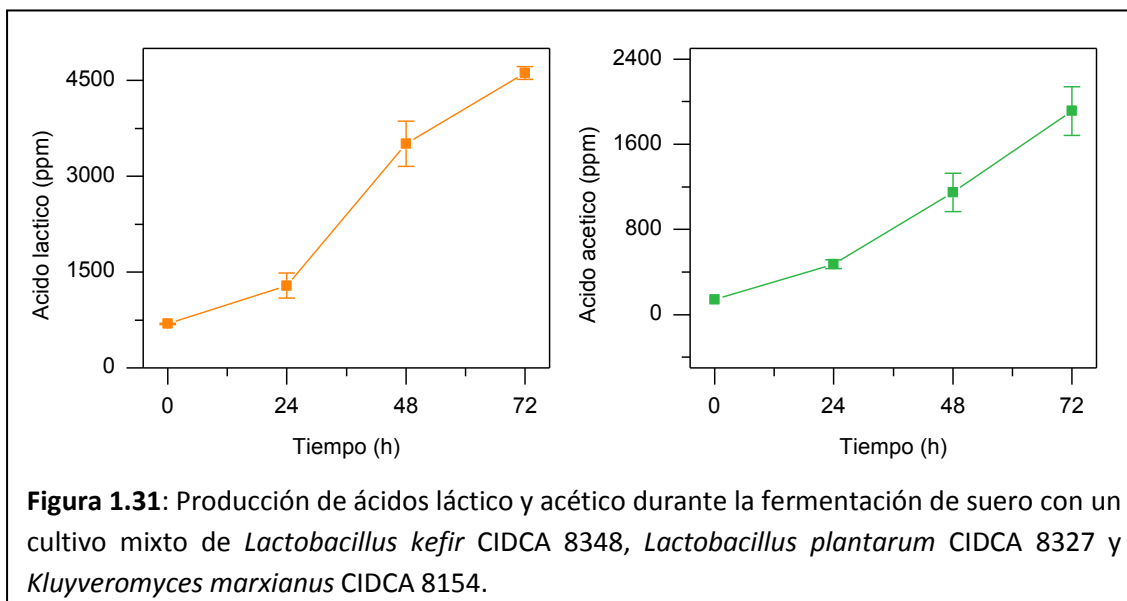
Se determinó la concentración de ácidos láctico y acético de los sueros fermentados con cepas individuales y en cultivo mixto (Tabla 1.16). Pudo notarse que el suero fermentado con *L. kefir* (pH 5.7) presentó baja concentración de ambos ácidos, mientras que el fermentado con *L. plantarum* con pH similar al obtenido con *K. marxianus* (pH ~ 5) presentó mayor contenido de ácido láctico y menor de ácido acético que dicho producto. El suero fermentado con el cultivo mixto presentó mayor concentración de ambos ácidos en relación a los fermentados con las cepas individuales. Este producto presentó alto contenido de ácido acético (0.19 %) en comparación con el suero fermentado con gránulos de kefir (0.08 %), con cultivo de suero (0.04 %) y con cultivo de leche (0.11 %). Mientras que su concentración de ácido láctico fue intermedia entre el suero fermentado con cultivo de suero que presentó menor concentración (0.20 %) y los suero fermentados con cultivo

madre de leche y gránulos de kefir que presentan mayor concentración de este ácido (0.55 % y 0.90 % respectivamente).

**Tabla 1.16:** Concentración de ácidos láctico y acético en suero fermentado 27 h de con cepas aisladas de kefir inoculadas individualmente o en cultivo mixto.

	Ácido láctico (%)	Ácido acético (%)
<i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 8327	0.23 ± 0.02	0.04 ± 0.003
<i>Lactobacillus kefir</i> CIDCA 8348	0.11 ± 0.01	0.04 ± 0.004
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CIDCA 8154	0.13 ± 0.01	0.15 ± 0.02
Cultivo mixto	0.46 ± 0.01	0.19 ± 0.02

La producción de ácido láctico y ácido acético durante la fermentación en el cultivo mixto ocurre durante todo el período de incubación (Figura 1.31).



Los resultados obtenidos indican que es posible utilizar el suero como medio para el crecimiento de *L. plantarum* y *K. marxianus*, asimismo es posible emplearlo como sustrato para el cultivo mixto de lactobacilos y levaduras aisladas de kefir. La fermentación de suero con cepas aisladas de kefir podría permitir la obtención de productos fermentados con composición microbiológica definida. Por otro lado constituye un sistema simplificado siendo más sencillo controlar las variables para la obtención de un producto de calidad más constante que al utilizar gránulos de kefir y cultivos madre como *starters*.

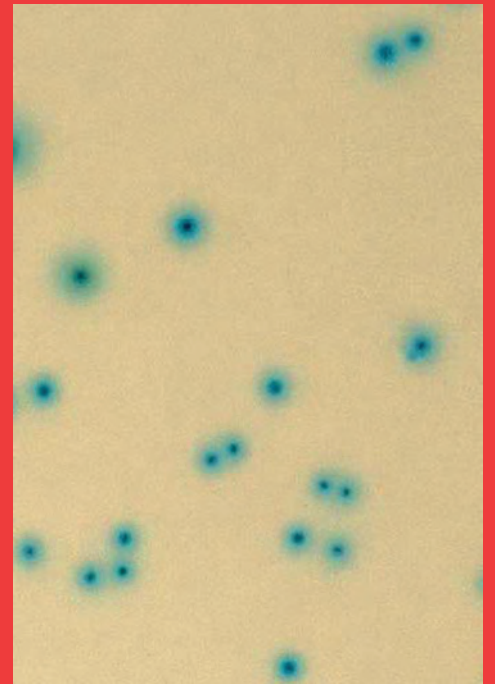
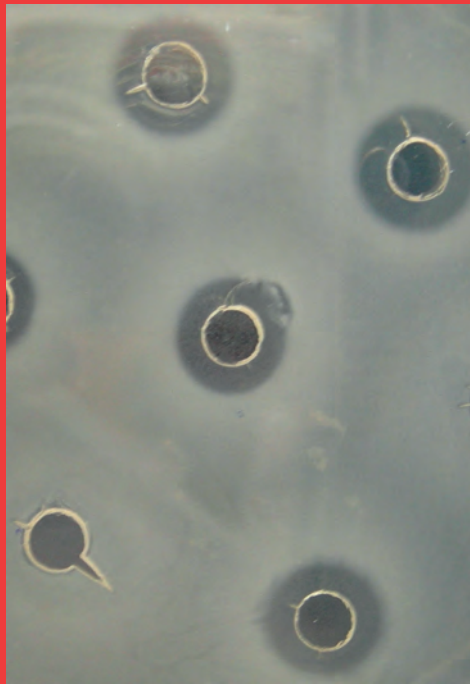
## CONCLUSIONES

- Los gránulos de kefir cultivados en suero durante 20 fermentaciones sucesivas de 24 h a 20 °C presentan similar crecimiento, aspecto macroscópico, composición química y composición microbiológica que aquellos cultivados en leche en iguales condiciones.
- El suero fermentado con gránulos de kefir al 10 % p/v durante 24 h a 20 °C, tiene mayor concentración de levaduras y menor de bacterias ácido lácticas, aunque presenta similar contenido de lactosa, de ácido láctico y perfil DGGE que la leche fermentada en iguales condiciones.
- Los gránulos de kefir cultivados en suero y el suero fermentado con los mismos contienen microorganismos pertenecientes a las especies: *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus parakefir*, *Lactococcus lactis*, *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae*.
- Cuando los gránulos son inoculados en suero en concentración 1 % p/v el producto fermentado obtenido presenta similar concentración de levaduras y mayor concentración de bacterias ácido lácticas que al inocular los gránulos en concentración 10 % p/v. Sin embargo la acidificación, degradación de lactosa y producción de ácidos orgánicos es menor al emplear menor concentración de inóculo. Se seleccionó por lo tanto el empleo de gránulos en concentración 10 % p/v a fin de aumentar la velocidad de fermentación.
- El empleo de sueros con distinta composición química como sustratos para la fermentación con gránulos de kefir no afecta significativamente las características del producto obtenido.

- El empleo de temperaturas de incubación de 30 °C y 37 °C no es factible en fermentaciones de suero de 24 h dado que los gránulos no se preservan como *starters* viéndose afectada su capacidad de crecimiento, aspecto macroscópico, composición microbiológica y química. Estos cambios se reflejan asimismo en un desbalance de la composición microbiológica de los productos fermentados.
- Los sueros fermentados con cultivos madre en leche y suero presentan diferencias en su pH, composición microbiológica y contenido de ácidos orgánicos respecto al suero fermentado con gránulos de kefir.
- Las cepas aisladas de kefir *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 y *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327 son capaces de crecer empleando suero como sustrato y acidificarlo mediante la producción de ácidos orgánicos, mientras que *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 presenta escaso crecimiento en este medio. Cuando se cultivan las tres cepas en forma conjunta se potencia el crecimiento *L. kefir* y la producción de ácidos orgánicos durante la fermentación.
- Se puede concluir que el suero es un sustrato adecuado para la fermentación con gránulos de kefir a 20 °C, influyendo la proporción de gránulos en las características del producto obtenido. Asimismo es posible utilizar cultivos madre o cepas aisladas de kefir como *starters* alternativos.

## Capítulo 2: Efecto inhibitorio de suero fermentado contra patógenos intestinales: ensayos *in vitro*

---



## INTRODUCCIÓN

*Salmonella enterica* y *Escherichia coli* se encuentran entre los patógenos intestinales que causan mayores pérdidas económicas en la industria avícola y constituyen además un riesgo de transmisión al hombre a través del consumo de alimentos derivados (Mor-Mur y Yuste, 2010). Debido a las crecientes restricciones en el uso de antibióticos en la producción primaria, ha surgido como alternativa de control la aplicación de otros antimicrobianos tales como ácidos orgánicos en el agua, el alimento y camas de las aves con el fin de crear medioambientes adversos para la colonización del patógeno. Resulta de sumo interés el desarrollo de productos naturales que sean inocuos para el medioambiente, seguros para las aves y los consumidores.

Se ha demostrado que el kefir inhibe el crecimiento de *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* sp., *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Listeria monocytogenes* (Brialy y col. 1995; Garrote y col., 2000; Rodrigues y col., 2005).

En esta parte del trabajo se pretende analizar la efectividad de distintos sueros fermentados con kefir, descritos en el Capítulo 1, para inhibir cepas de *E. coli* y *Salmonella enterica* aisladas a partir de aves infectadas o alimentos derivados contaminados. Este conocimiento es un primer paso en el estudio sobre la posibilidad de aplicar estos productos para el control de enteropatógenos en la industria avícola.

## OBJETIVOS

Determinar el efecto inhibitorio de distintos sueros fermentados contra patógenos intestinales mediante ensayos *in vitro*.

### Objetivos particulares

- Evaluar la supervivencia de *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* al proceso de fermentación de suero con gránulos de kefir.
- Estudiar el efecto inhibitorio del crecimiento y bactericida de distintos sueros fermentados sobre cepas de *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* aisladas a partir de aves infectadas o alimentos derivados contaminados. Analizar los metabolitos responsables del mismo.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Bacterias patógenas

Aislados patógenos de *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* fueron provistos por Controlvet S.A. (Tondela, Portugal). Se emplearon 100 aislados de *E. coli* obtenidos a partir de órganos (bazo, hígado y pulmones) de pollos infectados y que fueron identificados de acuerdo a la Norma Portuguesa (NP) 2308:1986. Asimismo se utilizaron 100 aislados de *Salmonella enterica* obtenidos a partir de muestras de alimentos o pollos infectados, que de acuerdo a la norma ISO 6579:2002/A1:2007, 23 fueron identificados como *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis), 21 como *Salmonella enterica* serovar. Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium), 7 como *Salmonella enterica* serovar. Infantis (*Salmonella* Infantis) y 49 no pudieron ser tipificados.

También se utilizó *Salmonella* Enteritidis CIDCA 101 aislada de una muestra clínica del Hospital de Pediatría Prof. Juan P. Garrahan, Buenos Aires, Argentina provista por el Dr. H. Lopardo. Su identificación se realizó mediante ensayos bioquímicos tradicionales y por serotipificación mediante el empleo de anticuerpos flagelares y somáticos.

### 2. Reducción de la concentración de *Escherichia coli* y *Salmonella* Enteritidis en suero por fermentación con gránulos de kefir

Se inocularon 100 ml de suero con los aislados *S. Enteritidis* 2713 o *E. coli* 2710 en concentración final  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  UFC/ml. El suero contaminado se incubó a 20 °C con agitación, directamente o luego de la adición de 10 % p/v de gránulos de kefir. Luego de 24 h de incubación se analizó la concentración de patógenos en el suero y en el suero fermentado. Cuando fue necesario se realizaron diluciones seriadas 1:10 en triptona 0.1 % y luego se llevaron a cabo recuentos empleando medios diferenciales. Para *Salmonella* se empleó medio Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) agar (Merck, D-64271 Darmstadt, Germany) y las colonias negras características se contaron luego de 24 h de incubación a 37 °C. El recuento diferencial de *E. coli* se realizó en placas de Triptona Bilis X-Glucuronido (TBX) agar

(Merck, D-64271 Darmstadt, Germany) sembradas con 1 ml de la dilución adecuada en profundidad y las colonias celestes se contaron luego de 24 h de incubación a 44 °C. Los experimentos se realizaron por triplicado.

La supervivencia de bacterias patógenas luego de la fermentación fue evaluada mediante el mismo procedimiento para concentraciones de patógeno iniciales de  $10^2$  y  $10^4$  CFU/ml para los aislados *E. coli* 2760, *E. coli* 2622, *E. coli* 2751, *E. coli* 2846, *Salmonella enterica* no serotificada 54, *Salmonella* Typhimurim 45, *Salmonella* Infantis 2729 y *Salmonella* Enteritidis 735.

### 3. Preparación de sobrenadantes

Se obtuvieron sobrenadantes de suero fermentado por centrifugación a 13000 x g durante 15 min. Los mismos fueron filtrados a través de una membrana de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0.45  $\mu$ m (Orange Scientific, T Alleud, Belgium). Los sobrenadantes estériles se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

Mediante este mismo procedimiento se obtuvieron sobrenadantes de: suero fermentado llevado a pH 4.5 y a pH 7 con NaOH 2.5 N (Merck, Darmstadt, Germany), suero fermentado calentado por 20 min a 100 °C, suero acidificado a pH 3.5 con HCl 2 N y suero suplementado con ácido láctico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a la concentración presente en el suero fermentado.

### 4. Ensayo de inhibición por difusión en agar

La actividad inhibitoria de los sobrenadantes sobre microorganismos patógenos se determinó por ensayos de difusión en agar. Los microorganismos patógenos se crecieron en agua peptonada tamponada (APT, Biokar Diagnostics). Se colocó 1 ml de una suspensión conteniendo  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml sobre una placa de petri con 12 ml de medio Müller Hinton agar (Biokar Diagnostics) y se distribuyó homogéneamente sobre la superficie. El líquido excedente se retiró de la placa y la misma se dejó secar 5 a 10 minutos abierta en una cabina de flujo laminar clase II (modelo BIO-II-A, Telstar S. A.). Luego se realizaron en el medio de cultivo orificios de 5 mm de diámetro, en cada uno de los cuales

se sembraron 40  $\mu$ l de los sobrenadantes a ensayar. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C y se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento en 3 direcciones alrededor de cada orificio.

### **5. Determinación de la concentración inhibitoria y bactericida mínima**

Para determinar la concentración inhibitoria y bactericida mínima se realizaron diluciones de los sobrenadantes de suero fermentado en agua peptonada tamponada (APT) a concentraciones 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % y 70 % en un volumen final de 1 ml. Luego cada tubo se inoculó con 50  $\mu$ l de una suspensión del microorganismo patógeno en concentración  $1.5 \times 10^7$  UFC/ml. Los tubos se incubaron durante 24 h a 37 °C. Se observó el crecimiento del patógeno (turbidez) en los tubos. La menor concentración a la que se produjo una inhibición completa del crecimiento visible fue considerada la concentración inhibitoria mínima (CIM). De aquellos tubos en los que no se observó turbidez se realizaron estrías en medio Müeller Hinton agar. La menor concentración de sobrenadante de suero fermentado para la cual no hubo crecimiento en las estrías se consideró la concentración bactericida mínima (CBM).

### **6. Efecto de los sobrenadantes de suero fermentado con gránulos de kefir sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Salmonella* Enteritidis.**

Se analizó la inhibición del crecimiento de *S. Enteritidis* 2713 y *E. coli* 2710 por sobrenadantes de suero fermentado con gránulos de kefir mediante un ensayo turbidimétrico.

El crecimiento del patógeno en caldo nutritivo conteniendo suero fermentado se analizó a través de mediciones de turbidez con un espectrofotómetro SmartSpec Plus™ (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA). Se diluyó sobrenadante de suero fermentado a concentraciones 10 %, 20 %, 30 % y 40 % en caldo nutritivo en un volumen final de 5 ml. Luego se inocularon todas las diluciones con 50  $\mu$ l de una suspensión con  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml de patógeno. Se homogenizó y se midió la densidad óptica (DO) inicial a  $\lambda=600$  nm. Se

incubó a 37 °C, a intervalos de 15 minutos se tomaron muestras y se midió la DO. Luego se graficó la DO en función del tiempo.

### **7. Efecto de los sobrenadantes de suero fermentado con cepas aisladas kefir sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Salmonella* Enteritidis.**

Se estudió el efecto inhibitorio de sobrenadantes de suero fermentado con cepas aisladas de kefir sobre el crecimiento de *S. Enteritidis* 2713 y *E. coli* 2710. Para esto primero se fermentó suero con *L. kefir* CIDCA 8348, *L. plantarum* CIDCA 8327 y *K. marxianus* CIDCA 8154 inoculadas individualmente o combinadas según lo descrito en el sección 3.3 del capítulo 1. Luego se evaluó el efecto inhibitorio de los sobrenadantes de estos cultivos adicionados a caldo nutritivo en concentraciones de 10 a 100 % midiendo la densidad óptica a 600 nm luego de distintos tiempos de incubación.

### **8. Supervivencia de patógenos en sobrenadantes de suero fermentado**

Se analizó la supervivencia de *Salmonella* Enteritidis 2713 y de *E. coli* 2710 en sobrenadante de suero fermentado 24 h a 20 °C con gránulos de kefir en concentración 10 % p/v. Para esto, un cultivo de 18 h del microorganismo patógeno en 5 ml de APT se centrifugó durante 10 min a 8000 x g. El pellet se resuspendió en el mismo volumen de sobrenadante de suero fermentado estéril en concentración 60 % y 100 % y se incubó a 37 °C. A intervalos de tiempo predeterminados se tomaron alícuotas y se determinó la concentración de microorganismos viables (UFC/ml) en medio Müller Hinton agar.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Reducción de la concentración de *Escherichia coli* y *Salmonella* Enteritidis en suero por fermentación con gránulos de kefir

El suero, por ser rico en nutrientes, es contaminado fácilmente por microorganismos del medio ambiente. Es de interés evaluar si los metabolitos producidos durante la fermentación tienen efecto inhibitorio sobre microorganismos contaminantes de manera de garantizar la obtención de un producto libre de patógenos y con un estándar microbiológico adecuado.

La capacidad del kefir de excluir microorganismos contaminantes, por competencia por los nutrientes y producción de metabolitos inhibitorios, permite que su consumo sea seguro aún cuando se elabora de manera artesanal, en condiciones no estériles y a temperatura ambiente.

Para evaluar la supervivencia de patógenos al proceso de fermentación se inoculó suero con *E. coli* 2710 o con *S. Enteritidis* 2713 en concentraciones de  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^6$  UFC/ml. Inmediatamente después se adicionaron gránulos de kefir al 10 % y se incubó durante 24 h a 20 °C. Luego de la fermentación se evaluó la concentración de patógenos remanentes en el producto mediante recuento de microorganismos viables en placa empleándose medios diferenciales.

En suero (Tablas 2.1 y 2.2) independientemente de la concentración inicial ( $10^2$  a  $10^6$  UFC/ml), ambos patógenos alcanzaron en 24 h concentraciones superiores a  $10^6$  UFC/ml indicando que este es un medio apto para su desarrollo.

Cuando el suero conteniendo  $10^6$  UFC/ml de *Salmonella* Enteritidis 2713 fue fermentado durante 24 h con gránulos de kefir, la concentración del patógeno disminuyó 4 órdenes logarítmicos (Tabla 2.1) mientras que, cuando la concentración inicial de *Salmonella* fue menor a  $10^5$  UFC/ml no se detectó crecimiento del patógeno.

El mismo ensayo se realizó contaminando suero con  $10^2$  y  $10^4$  UFC/ml de otras 4 cepas de *Salmonella enterica* (*S. Typhimurium* 45, *S. Infantis* 2729, *S. Enteritidis* 735 y una cepa de *S. enterica* no serotificada 54). Cuando el suero contaminado con cada una de las cepas fue

fermentado durante 24 h con gránulos de kefir, no se detectó la presencia de *Salmonella* en el producto.

**Tabla 2.1:** Concentración de *Salmonella* Enteritidis 2713 en suero contaminado artificialmente con distintas concentraciones de este patógeno luego de su incubación durante 24 h a 20 °C en ausencia o en presencia de gránulos de kefir (10 % p/v).

Concentración inicial en suero (UFC/ml)	Concentración luego de 24 h en suero en ausencia de gránulos de kefir (UFC/ml)	Concentración luego de 24 h en suero en presencia de gránulos de kefir (UFC/ml)
$1 \times 10^2$	$1.1 \times 10^6$	NC*
$1 \times 10^3$	$5.0 \times 10^6$	NC
$1 \times 10^4$	$7.2 \times 10^7$	NC
$1 \times 10^5$	$1.5 \times 10^9$	NC
$1 \times 10^6$	$5.0 \times 10^9$	$1.7 \pm 2.9 \times 10^2$

\*NC: no se detectó crecimiento del patógeno.

*E. coli* 2710 en suero creció hasta concentraciones mayores a  $10^7$  UFC/ml en 24 h a 20 °C. Cuando el suero contaminado con *E. coli* fue fermentado 24 h con gránulos de kefir la viabilidad del patógeno se redujo 2 órdenes logarítmicos en el producto (Tabla 2.2). El mismo resultado se obtuvo para los aislados *E. coli* 2760, *E. coli* 2622, *E. coli* 2751 y *E. coli* 2846.

**Tabla 2.2:** Concentración de *E. coli* 2710 en suero contaminado artificialmente con distintas concentraciones de este patógeno luego de su incubación durante 24 h a 20 °C en ausencia o en presencia de gránulos de kefir (10 % p/v).

Concentración inicial en suero (UFC/ml)	Concentración luego de 24 h en suero en ausencia de gránulos de kefir (UFC/ml)	Concentración luego de 24 h en suero en presencia de gránulos de kefir (UFC/ml)
$1 \times 10^2$	$6.0 \times 10^7$	NC*
$1 \times 10^3$	$1.8 \times 10^8$	$2.0 \pm 2.0 \times 10^1$
$1 \times 10^4$	$3.1 \times 10^8$	$1.2 \pm 0.8 \times 10^2$
$1 \times 10^5$	$3.5 \times 10^8$	$2.2 \pm 3.1 \times 10^3$

\*NC: no se detectó crecimiento del patógeno.

Los datos obtenidos indican que la fermentación de suero con gránulos de kefir no sólo evita la proliferación de microorganismos patógenos que eventualmente pueden actuar como contaminantes sino que además posee la capacidad de reducir su concentración, contribuyendo de este modo a la calidad y seguridad del producto obtenido.

Otros autores han estudiado la supervivencia de patógenos durante la fermentación de leche con gránulos de kefir. Garrote y col. (2000) describieron que al fermentar con gránulos de kefir (2 % p/v) leche contaminada con *E. coli*, el crecimiento del patógeno se detiene hallándose a la misma concentración al inicio de la fermentación que luego de 24 h. Otros autores sin embargo, hallaron que *E. coli*, *S. Typhimurium* y *Staphylococcus aureus* son capaces de sobrevivir y crecer durante la fermentación de leche con 5 % de gránulos de kefir (Karagözlü y col., 2007). También se ha descrito un bajo efecto inhibitorio de microorganismos contaminantes cuando en lugar de utilizar gránulos de kefir, se emplea cultivo madre en leche. Gulmez y Guven (2003) hallaron que, cuando leche contaminada con patógenos es inoculada con 5 % v/v de cultivo madre, *E. coli* y *Yersinia enterocolitica* aumentan su concentración aproximadamente un orden logarítmico en 24 h de incubación, mientras que el crecimiento de *Listeria monocytogenes* se detiene.

En relación a los estudios previos mencionados, realizados en leche, en el presente trabajo se halló mayor reducción de microorganismos contaminantes durante la fermentación de suero con gránulos de kefir. Tal como se demostró en el capítulo 1, el descenso de pH debido a la producción de ácidos orgánicos ocurre rápidamente en suero desde el inicio de la fermentación, lo cual podría inhibir el crecimiento de los patógenos desde las primeras horas de incubación. Los resultados indican además que durante la fermentación se producen metabolitos que presentan efecto bactericida sobre *S. enterica* y *E. coli*.

La capacidad inhibitoria del suero fermentado sobre estos patógenos se analizó en mayor detalle empleando distintas metodologías, tal como se describe a continuación.

## 2. Inhibición de *Salmonella* Enteritidis y *Escherichia coli* por sobrenadantes de suero fermentado

### 2.1 Ensayo de difusión en agar

Se evaluó mediante ensayos de difusión en agar el efecto inhibitorio de distintos sueros fermentados, descritos y caracterizados en el Capítulo 1, sobre 100 aislados de *S. enterica* y 100 de *E. coli*. Se comparó el efecto inhibitorio de distintos tipos de sueros fermentados con gránulos de kefir en concentración 10 % p/v. Asimismo se evaluó la capacidad inhibitoria de suero fermentado con 1 % p/v de gránulos de kefir y con cultivos madre en suero y leche (Tabla 2.3).

**Tabla 2.3:** Actividad inhibitoria de diferentes sueros fermentados sobre 100 cepas de *Salmonella enterica* y 100 cepas de *Escherichia coli* evaluada mediante ensayos de difusión en agar.

Starter	Suero	Diámetro de la zona de inhibición promedio ( $\pm$ Desvío estándar), mm	
		<i>S. enterica</i> (n =100) <sup>2</sup>	<i>E. coli</i> (n=100)
Gránulos de kefir 10 %p/v	Bovino en polvo	9.20 ( $\pm$ 1.06) <sup>Aa 1</sup>	8.92 ( $\pm$ 0.82) <sup>Ab</sup>
	Bovino líquido	10.37 ( $\pm$ 0.69) <sup>Ba</sup>	9.69 ( $\pm$ 0.59) <sup>Bb</sup>
	Ovino líquido	10.37 ( $\pm$ 0.61) <sup>Ba</sup>	9.97 ( $\pm$ 0.64) <sup>Cb</sup>
Gránulos de kefir 1 %p/v	Bovino en polvo	NI <sup>3</sup>	NI
	Bovino líquido	NI	NI
	Ovino líquido	NI	NI
Cultivo madre en suero	Bovino en polvo	NI	NI
Cultivo madre en leche	Bovino en polvo	NI	NI

<sup>1</sup>Las letras mayúsculas comparan para cada especie la sensibilidad a los distintos sueros fermentados (filas). Las minúsculas comparan el efecto inhibitorio de cada suero sobre *S. enterica* y *E. coli* (columnas). Los promedios de los diámetros de la zona de inhibición con igual letra no difieren significativamente ( $\alpha=0,05$ ).

<sup>2</sup> n: número de cepas testeadas.

<sup>3</sup> NI: no se detectan halos de inhibición.

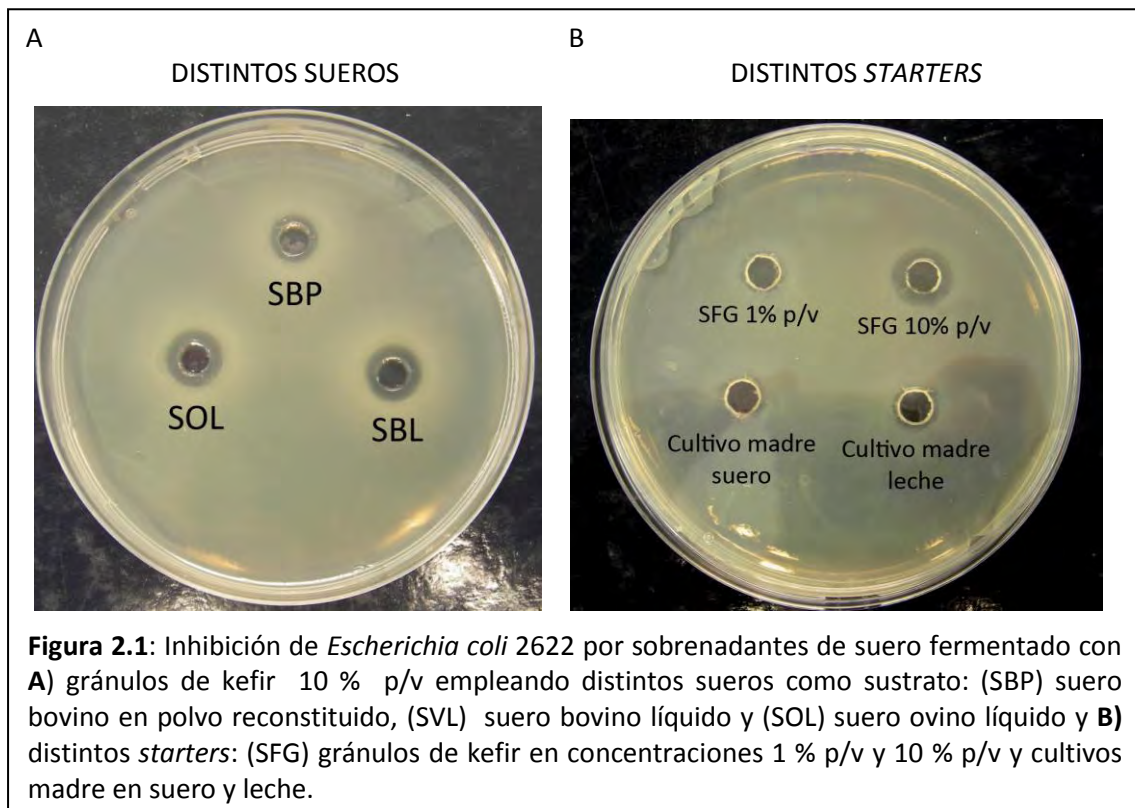
Los productos obtenidos al fermentar distintos sueros (bovino líquido, bovino en polvo reconstituido y ovino líquido) con gránulos de kefir en concentración 10 % p/v inhibieron el crecimiento de todas las cepas estudiadas (Tabla 2.3). Para el mismo producto fermentado el promedio de los halos de inhibición fue significativamente mayor para *S. enterica* que



para *E. coli*. También hubo diferencias significativas en la capacidad inhibitoria al emplear distintos sueros como sustrato. Los sueros líquidos bovino y ovino fermentados presentaron mayor efecto inhibitorio que el producto obtenido a partir de suero en polvo reconstituido.

El suero fermentado mediante cultivos madre en suero o leche, así como el obtenido a partir de gránulos en concentración 1 % p/v, todos con pH mayor a 4, no presentaron actividad inhibitoria del crecimiento de *S. enterica* ni de *E. coli*.

Se presenta a modo de ejemplo los halos de inhibición obtenidos para una cepa de *E. coli* empleando distintos sueros fermentados con gránulos de kefir 10 % p/v y distintos *starters* (Figura 2.1).

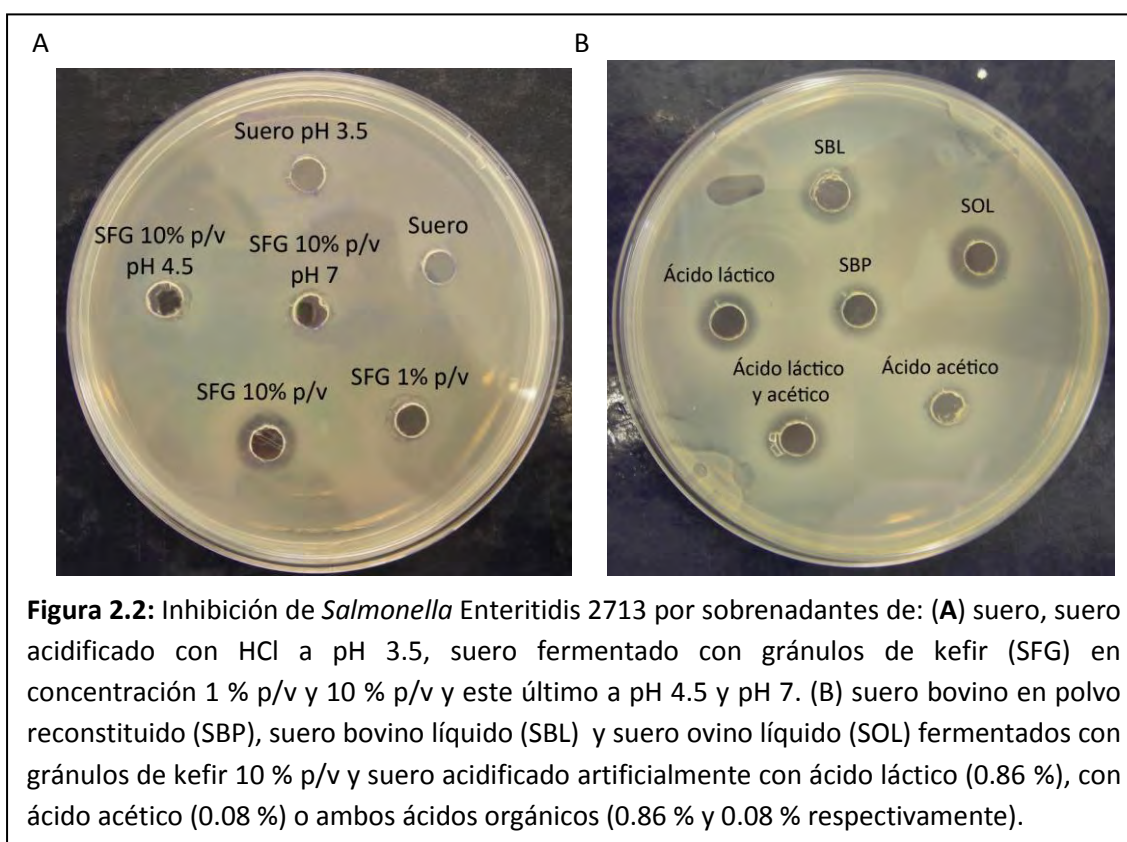


A fin de indagar la naturaleza de los metabolitos involucrados en el efecto inhibitorio se realizaron diferentes tratamientos a los sobrenadantes.

La capacidad inhibitoria de los sobrenadantes luego de un tratamiento térmico (20 min a 100 °C) se evaluó mediante ensayos de difusión en agar sobre 10 cepas de *S. enterica* y 10 de *E. coli*. El diámetro promedio de la zona de inhibición fue  $9.5 \pm 0.7$  mm para *S. enterica* y

9.1 ± 0.9 mm para *E. coli*. Estos valores no fueron significativamente diferentes respecto a los de los sobrenadantes sin tratar ( $\alpha=0.05$ ), indicando que el agente inhibitorio no es una sustancia termolábil.

A fin de analizar la influencia del pH en la inhibición se evaluaron los halos de inhibición generados por suero acidificado con ácido clorhídrico hasta pH 3.5 y de suero fermentado con gránulos de kefir a pH 4.5 y pH 7. Ninguno de estos productos fue capaz de inhibir los 50 aislados de *S. enterica* y 50 de *E. coli* evaluados. Se muestra como ejemplo una placa obtenida para una cepa de *Salmonella* Enteritidis (Figura 2.2 A).



Por lo tanto aunque el pH en sí mismo no fue suficiente para inhibir el crecimiento de *S. enterica* y de *E. coli*, el efecto inhibitorio fue dependiente del bajo pH. En base a estos resultados se planteó la necesidad de analizar la importancia de los ácidos orgánicos producidos durante la fermentación en la acción antibacteriana.

Se evaluó el efecto inhibitorio de suero acidificado artificialmente con ácido láctico, ácido acético o ambos, en concentraciones y pH similares a las del suero fermentado con

gránulos de kefir. El suero acidificado con ácido acético solo no presentó efecto inhibitorio a esta concentración, mientras que los halos obtenidos para el suero adicionado con ácido láctico solo o con ambos ácidos resultaron semejantes (Figura 2.2 B). El suero conteniendo la misma concentración de ácido láctico que el producto fermentado presentó halos de inhibición promedio de  $9.3 \pm 0.7$  mm para 10 aislados de *S. enterica* y de  $8.8 \pm 0.6$  mm para 10 aislados de *E. coli*. Estos valores no resultaron significativamente diferentes ( $\alpha=0.05$ ) respecto a los obtenidos para sobrenadante de suero fermentado (Tabla 2.3), sugiriendo que el ácido láctico no disociado es el principal metabolito responsable de la actividad inhibitoria.

El uso de ácido láctico es uno de los métodos más antiguos empleados para inhibir el crecimiento de bacterias Gram (-) y Gram (+) (Helander y col., 1997). El principal componente involucrado en dicha inhibición es la forma no disociada de este ácido orgánico que puede atravesar las membranas bacterianas y así bajar el pH intracelular causando efectos adversos en numerosas funciones celulares (Presser y col., 1997; Carpenter y Broadbent, 2009). Teniendo en cuenta el pH, la concentración de ácido y la constante de disociación del mismo, se calculó la concentración de la forma no disociada del ácido láctico en los productos fermentados que presentaron poder inhibitorio (Tabla 2.4). Los sueros bovino y ovino líquidos fermentados con 10 % p/v de gránulos de kefir, que presentaron mayor efecto inhibitorio (Tabla 2.3), tuvieron mayor contenido de ácido láctico no disociado, confirmando el rol de este metabolito en la inhibición.

**Tabla 2.4:** pH, concentración de ácido láctico total y ácido láctico no disociado de los sobrenadantes de distintos sueros fermentados con 10 % p/v de gránulos de kefir

Suero	pH	Ácido láctico total (mM)	Ácido láctico no disociado (mM)
Bovino en polvo reconstituido	3.65	100	61.86
Bovino líquido	3.54	110	74.39
Ovino líquido	3.39	133	99.30

De manera similar a lo hallado en el presente estudio en suero, se ha descrito que la leche fermentada con gránulos de kefir presenta capacidad de inhibir el crecimiento de *E. coli* (Brialy y col., 1995; Garrote y col., 2000; Rodrigues y col., 2005) y de *Salmonella* spp. (Garrote y col., 2000; Rodrigues y col., 2005). El kefir posee otros metabolitos antimicrobianos además de los ácidos orgánicos, tales como etanol, acetona, acetaldehído (Guzel-Seydim y col., 2000; Beshkova y col., 2003), diacetilo (Beshkova y col., 2003), CO<sub>2</sub> (Garrote y col., 1997; Grønnevik y col., 2011) y polisacáridos (Rodrigues y col., 2005; Barbosa y col., 2011). Asimismo cepas aisladas de kefir son capaces de producir bacteriocinas (Ryan y col., 1996; Powell y col., 2007; Simova y col., 2008). Sin embargo la contribución de dichos componentes en el efecto antimicrobiano del kefir no ha podido dilucidarse completamente. Garrote y col. (2000) describieron que los ácidos orgánicos no disociados eran los principales implicados en el efecto antimicrobiano del kefir. En concordancia con dicho estudio, en el presente análisis se demuestra que el efecto inhibitorio del suero fermentado con gránulos de kefir sobre *S. enterica* y *E. coli* se debe fundamentalmente a su contenido de ácido láctico no disociado.

## 2.2 Concentración inhibitoria y bactericida mínima

Luego de determinar que los productos obtenidos por fermentación de distintos sueros con 10 % p/v de gránulos de kefir presentan actividad antimicrobiana se determinó su concentración inhibitoria mínima (CIM) y bactericida mínima (CBM) mediante ensayos de inhibición por dilución en medio líquido.

Estos parámetros se calcularon sobre 20 cepas de *S. enterica* y 20 cepas de *E. coli* para suero bovino en polvo reconstituido fermentado. Asimismo se analizó el poder inhibitorio de los sueros ovino y bovino líquidos fermentados sobre 10 aislados de cada una de estas especies.

La CIM de los 3 sueros fermentados fue 30 % para *E. coli*. Para *S. enterica* la CIM de los sueros bovino y ovino líquidos fermentados también fue 30 %, pero la de suero bovino en polvo reconstituido fue 30 % para 10 cepas y 40 % para otras 10 cepas de esta especie.

Paralelamente con el análisis de la CIM se determinó la concentración bactericida mínima (CBM) de los distintos sueros fermentados sobre *S. enterica* y *E. coli*. La CBM resultó variable de acuerdo al aislado analizado (Tabla 2.5). La CBM de los sobrenadantes de suero bovino y suero ovino líquidos fermentados fue entre 40 % y 60 % para la mayoría de los aislados de *S. enterica* y para todos los de *E. coli*. Mientras que para suero en polvo reconstituido fermentado la CBM resultó entre 50 % y 70 % para la mayor parte de los aislados de ambas especies.

**Tabla 2.5:** Concentración bactericida mínima (CBM) de suero fermentado con 10 % p/v de gránulos de kefir sobre *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*.

CBM (%)	<i>S. enterica</i>			<i>E. coli</i>		
	SBP <sup>a</sup>	SBL	SOL	SBP	SBL	SOL
30	2/21 <sup>b</sup>	-	1/10	1/20	-	-
40	2/21	2/10	4/10	-	1/11	1/10
50	4/21	4/10	2/10	7/20	7/11	7/10
60	3/21	4/10	3/10	6/20	3/11	2/10
70	9/21	-	-	4/20	-	-
90	1/21	-	-	2/20	-	-

<sup>a</sup> Las columnas corresponden a sobrenadantes de diferentes sueros fermentados con gránulos de kefir 10 % p/v. SBP: suero bovino en polvo reconstituido, SBL: suero bovino líquido, SOL: suero ovino líquido.

<sup>b</sup> Número de aislados de *S. enterica* o *E. coli* con cierta concentración bactericida mínima / número total de cepas estudiadas.

Considerando que por ensayos de inhibición por difusión en agar se determinó que el principal agente inhibitorio del suero fermentado es el ácido láctico no dissociado, se calculó su contenido en los distintos sueros fermentados a las concentraciones a las que resultaron bacteriostáticos y bactericidas.

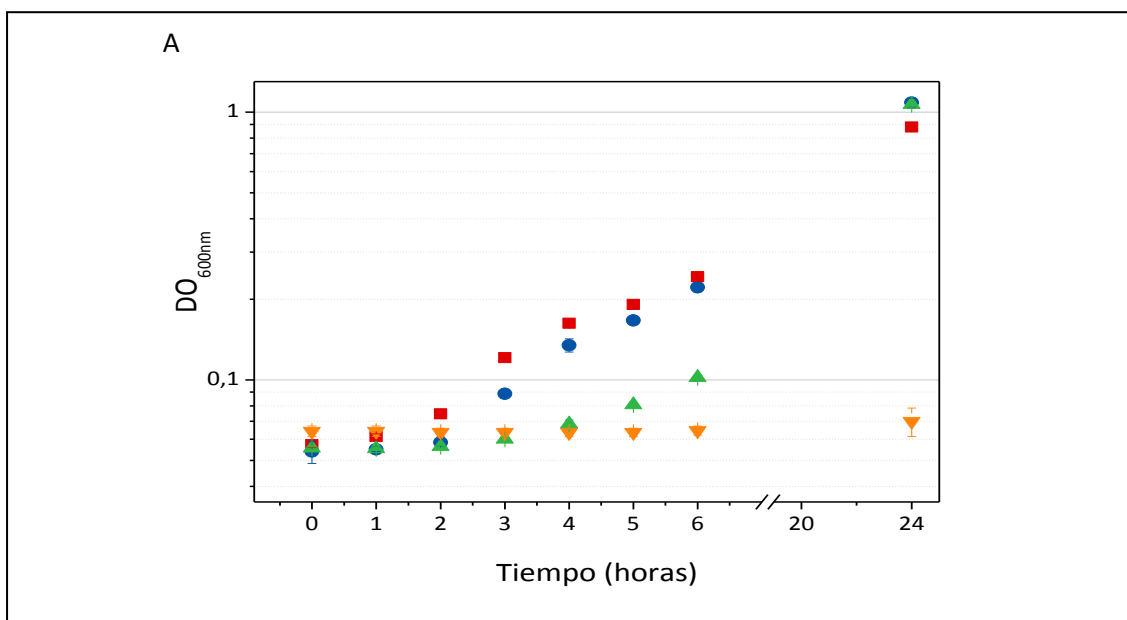
Las diluciones de suero fermentado con efecto bacteriostáticas contuvieron 10 a 20 mM de ácido láctico no dissociado. Mientras que su concentración en las diluciones con efecto bactericida fue entre 20 y 50 mM.

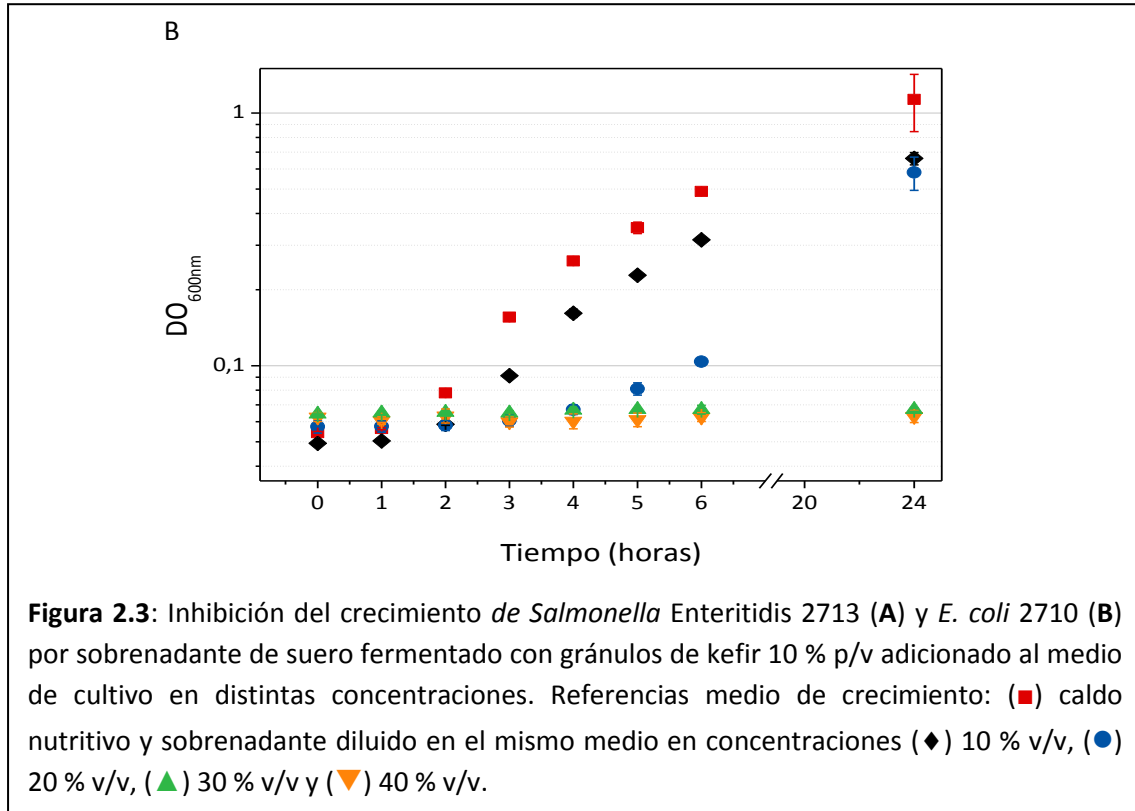
En concordancia con los resultados hallados en el presente trabajo Östling y Lindgren (1993) reportaron una CIM de 7mM de ácido láctico no disociado sobre un aislado de *Salmonella* sp. y 4 aislados de *E. coli*.

### 2.3 Cinéticas de crecimiento de *Salmonella* Enteritidis y *Escherichia coli* en presencia de distintas concentraciones de sobrenadante de suero fermentado

El crecimiento de *Salmonella* Enteritidis 2713 y *E. coli* 2710 en presencia de sobrenadante de suero fermentado con gránulos de kefir (10 % p/v) en distintas concentraciones se analizó mediante mediciones espectrofotométricas de turbidez en el tiempo.

Para *Salmonella* Enteritidis 2713 la curva de crecimiento no fue diferente respecto a la del control cuando se adicionó al medio de cultivo sobrenadante de suero fermentado en concentración 20 % v/v. Cuando el sobrenadante se adicionó en concentración 30 % v/v se prolongó la fase de latencia y se redujo la tasa de crecimiento, aunque la densidad óptica alcanzada luego de 24 h fue similar al control. En medio de cultivo conteniendo sobrenadante en concentración 40 % v/v el patógeno no desarrolló aún transcurridas 24 h de cultivo (Figura 2.3 A).





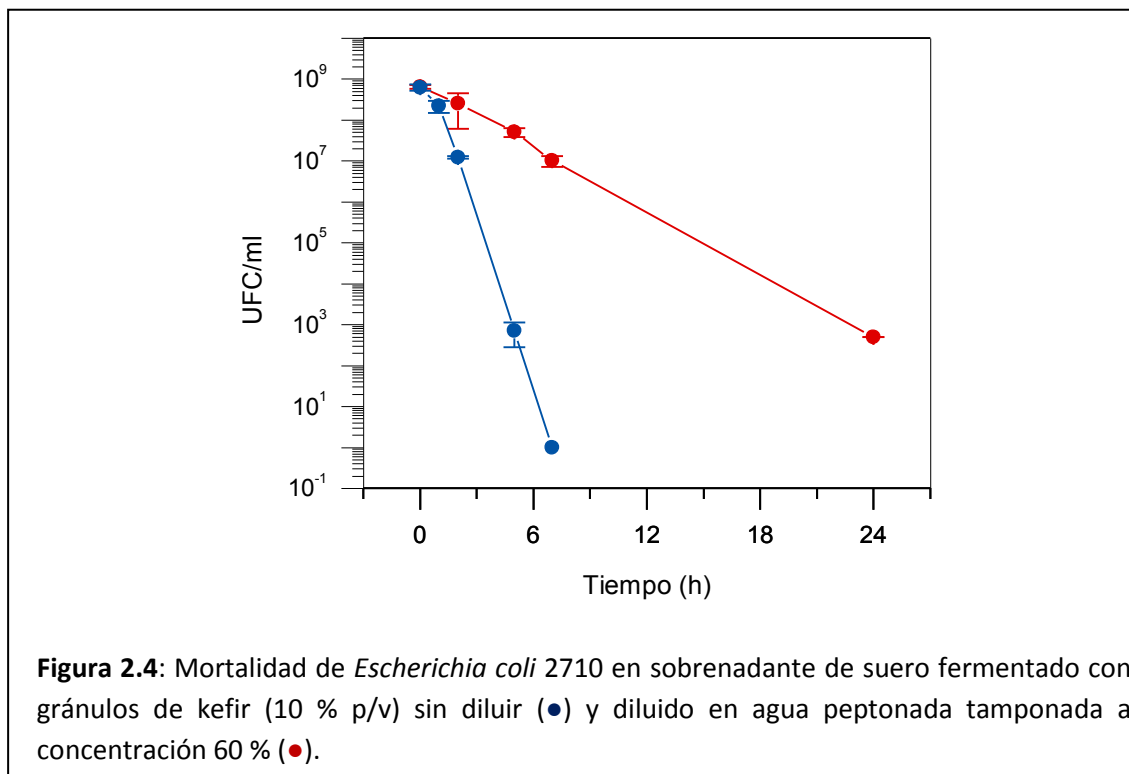
El crecimiento de *E. coli* 2710 se modificó aún en presencia de 10 % v/v de sobrenadante de suero fermentado, prolongándose la fase de latencia y disminuyendo la densidad óptica del cultivo a las 24 h de incubación de 1.1 a 0.7. Cuando se adicionó al medio de cultivo 20 % v/v de sobrenadante se ampliaron las diferencias respecto al control en los parámetros de crecimiento antes mencionados y se observó además una reducción de la tasa de crecimiento. Mientras que en medio con una concentración de sobrenadante igual o mayor a 30 % v/v el crecimiento de este patógeno se inhibió por completo (Figura 2.3 B).

#### 2.4 Curvas de muerte de *Salmonella* Enteritidis y *Escherichia coli* en sobrenadante de suero fermentado

El efecto bactericida del suero fermentado con gránulos de kefir (10 % p/v) sobre *S. Enteritidis* 2713 y *E. coli* 2710 se analizó siguiendo la curva de muerte de estos patógenos al ser expuestos a sobrenadante de este producto puro y diluido en medio de cultivo en concentración 60 % v/v. Se seleccionó esta dilución por hallarse próxima a la concentración

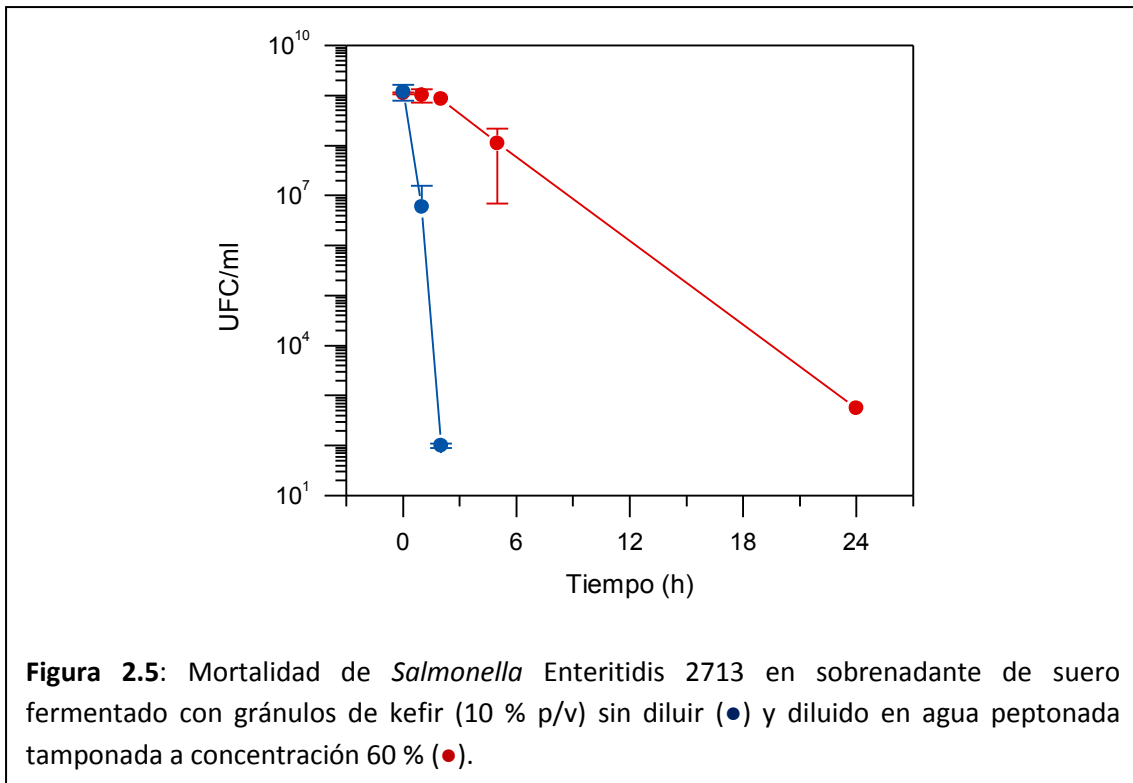
bactericida mínima de las cepas estudiadas, dado que la CBM de suero fermentado previamente determinada fue 50 % para *S. Enteritidis* 2713 y 60 % para *E. coli* 2710.

Cuando *E. coli* 2710 se incubó en 60 % de sobrenadante diluido en medio de cultivo APT su viabilidad disminuyó 2 órdenes logarítmicos en 7 h de incubación y luego de 24 h sólo sobrevivieron  $10^2$  UFC/ml. En sobrenadante de suero sin diluir no se detectaron microorganismos viables al cabo 7 h de incubación (Figura 2.4).



*Salmonella* Enteritidis 2713 presentó una mortalidad aún mayor en sobrenadante de suero fermentado. Cuando el sobrenadante se empleó en concentración 60 % el número de microorganismos viables descendió 3 órdenes logarítmicos en 5 h de incubación y la mortalidad fue total a las 24 h. Al exponer las bacterias a suero fermentado sin diluir las mismas perdieron su viabilidad en apenas 2 h de incubación (Figura 2.5).





De este modo, el poder inhibitorio del suero fermentado fue demostrado en el presente estudio mediante distintos métodos de análisis *in vitro*. Inicialmente se aplicó un estudio de **inhibición por difusión en agar** a fin de evaluar el efecto inhibitorio de distintos productos fermentados sobre numerosos microorganismos indicadores y analizar la naturaleza de los metabolitos implicados en la inhibición. Se determinó por este método que el suero fermentado con 10 % p/v de gránulos de kefir inhibe el crecimiento de 100 cepas de *Salmonella enterica* y 100 de *Escherichia coli*. La capacidad antimicrobiana de este producto se pudo atribuir a su contenido de ácido láctico no disociado. Los sueros fermentados empleando menor concentración de gránulos de kefir o cultivos madre en suero y en leche, con menor concentración de este agente antimicrobiano, no resultaron inhibitorios. Si bien los ensayos de difusión en agar permiten realizar una evaluación rápida de numerosos productos y microorganismos indicadores simultáneamente, la obtención de resultados cuantitativos mediante este método requiere la estandarización estricta del ensayo y aún así los resultados son menos precisos que al utilizar otros métodos (Davidson y Parish, 1989). Asimismo se ha descrito que la sensibilidad es baja en comparación con

otras técnicas (Galvin, 1999; Morgan, 2000). Sin embargo es de utilidad como un análisis previo a otros que requieren mayor cantidad de material y tiempo.

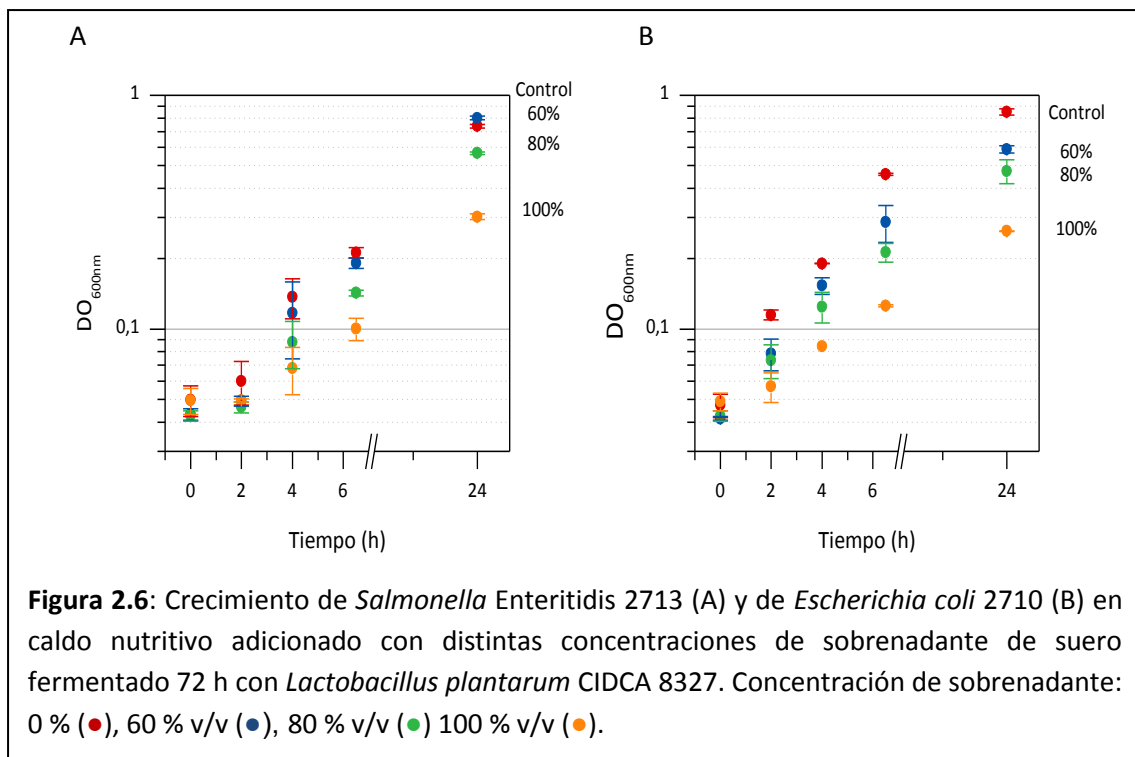
A fin de analizar cuantitativamente el poder inhibitorio del suero fermentado con gránulos de kefir se realizaron ensayos de **dilución en medio líquido**. Se calculó por este método la concentración inhibitoria y bactericida mínima del suero fermentado. Este conocimiento es útil para la aplicación del producto como aditivo antimicrobiano. Se determinó que el suero fermentado con gránulos de kefir es bacteriostático en concentraciones 30 a 40 %, conteniendo concentraciones de ácido láctico no disociado entre 10 y 20 mM. La concentración bactericida de este producto varió de acuerdo a la cepa indicadora analizada entre 40 y 70 %, conteniendo concentraciones de ácido láctico no disociado entre 20 y 50 mM.

Finalmente se aplicaron en este trabajo **métodos descriptivos** que permiten evaluar de manera más detallada la respuesta de los microorganismos a un agente antimicrobiano en el tiempo. Es posible por estos métodos determinar si se ve afectada la tasa de crecimiento, la cosecha máxima y/o la fase de latencia. Se realizaron mediciones del crecimiento por turbidez. Los ensayos de turbidez son sencillos, presentan buena repetitividad y requieren poco material. Sin embargo la concentración de microorganismos a la cual es posible realizar las mediciones es limitada, dado que la turbidez se detecta a concentraciones superiores a  $10^6$  UFC/ml y no es posible distinguir entre células viables y no viables. Se determinó por este método que el suero fermentado en concentraciones inferiores a la CIM actúa disminuyendo la cosecha máxima, prolongando la fase de latencia y/o retardando la velocidad de crecimiento. Las cinéticas empleando recuento permiten estudiar con mayor detalle cómo afecta un agente antimicrobiano la viabilidad de un microorganismo en el tiempo y analizar si el agente tiene un efecto letal. Este análisis permitió determinar que el suero fermentado en concentraciones próximas a la CBM causa una caída abrupta de la concentración de microorganismos viables, presentando efecto letal en pocas horas de exposición.

## 2.5 Efecto inhibitorio de sobrenadantes de suero fermentado con *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348, *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327 y *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 sobre *Salmonella* Enteritidis y *Escherichia coli*

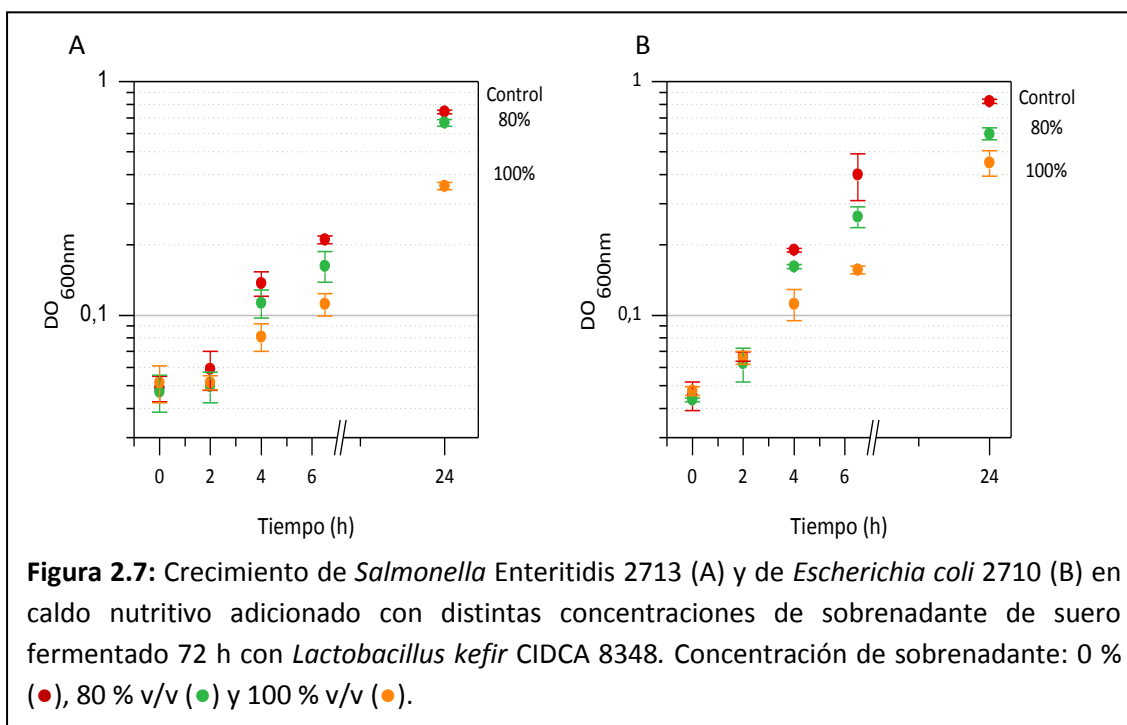
Se analizaron las cinéticas de crecimiento de *S. Enteritidis* 2713 y *E. coli* 2710 en presencia de suero fermentado con cepas aisladas de kefir cultivadas individualmente o en un cultivo mixto en suero.

El sobrenadante del suero fermentado con *L. plantarum* CIDCA 8327 redujo la tasa de crecimiento y la cosecha máxima de *S. Enteritidis* 2713 cuando su concentración en el medio de cultivo fue superior a 80 % (Figura 2.6 A) y de *E. coli* 2710 cuando fue igual o mayor a 60 % (Figura 2.6 B).

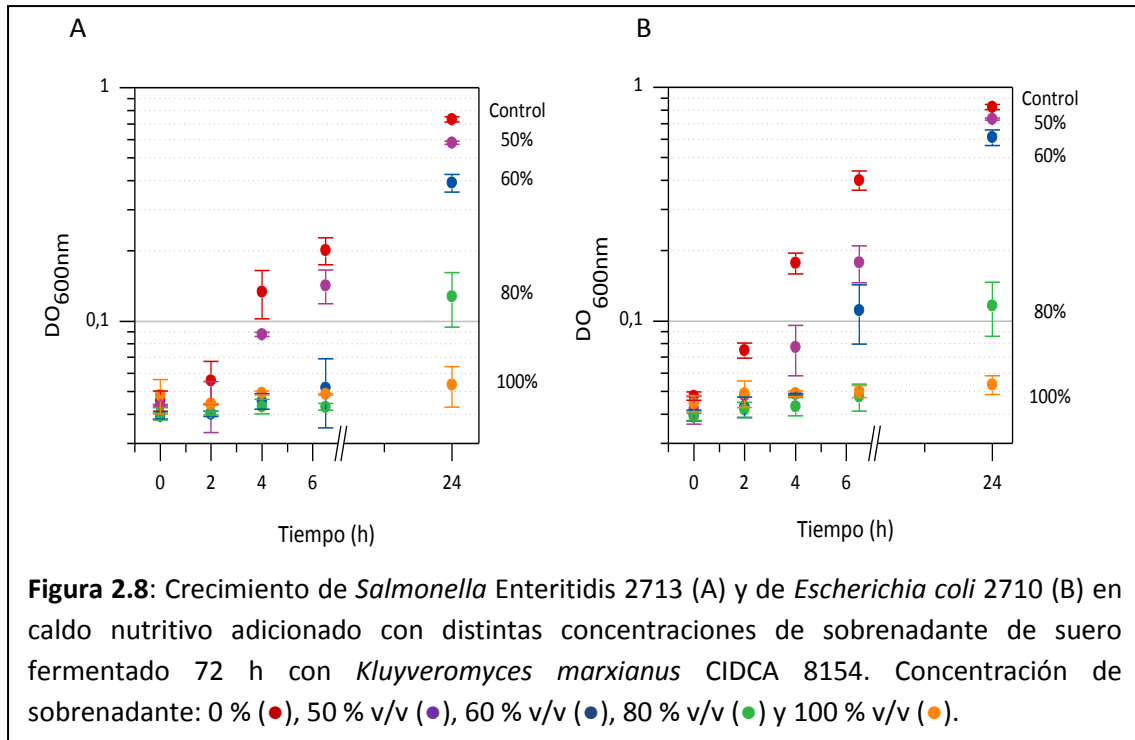


La tasa de crecimiento y la cosecha máxima de *S. Enteritidis* 2713 y de *E. coli* 2710 fue menor cuando se cultivaron en sobrenadante de suero fermentado con *L. kefir* CIDCA 8348 con respecto al control de cada uno de los patógenos crecidos en caldo nutritivo (Figura 2.7). Cabe destacar que este producto presenta actividad inhibitoria a pesar de su alto pH (5.7) y escaso contenido de ácidos orgánicos (0.11 % de ácido láctico y 0.04 % de ácido acético) (Capítulo 1, Tabla 1.16). El efecto inhibitorio podría deberse a la presencia de

otro/s metabolito/s en el sobrenadante de suero fermentado con *L. kefir*. Golowczyk y col. (2007) describieron que la capacidad bactericida sobre *Salmonella* Enteritidis de sobrenadantes de 8 cepas de *L. kefir* crecidas durante 48 h en MRS, no podía ser explicado sólo por la presencia de ácidos orgánicos, sugiriendo la producción de otros compuestos inhibitorios por estas cepas.



Entre los sobrenadantes de cultivos de cepas aisladas de kefir en suero, el de *K. marxianus* CIDCA 8154 fue el que presentó mayor efecto inhibitorio. En caldo nutritivo adicionado con 60 % v/v de este sobrenadante *Salmonella* Enteritidis 2713 no creció luego de 6 h 30 min indicando una prolongación de la fase de latencia. Luego de 24 h de incubación la densidad óptica alcanzada por este cultivo fue menor que en el control. Cuando se adicionó al medio sobrenadante en concentración 80 % v/v el crecimiento del patógeno fue prácticamente nulo alcanzando en 24 h una densidad óptica menor al 20 % de la que presentó el control (Figura 2.8 A).

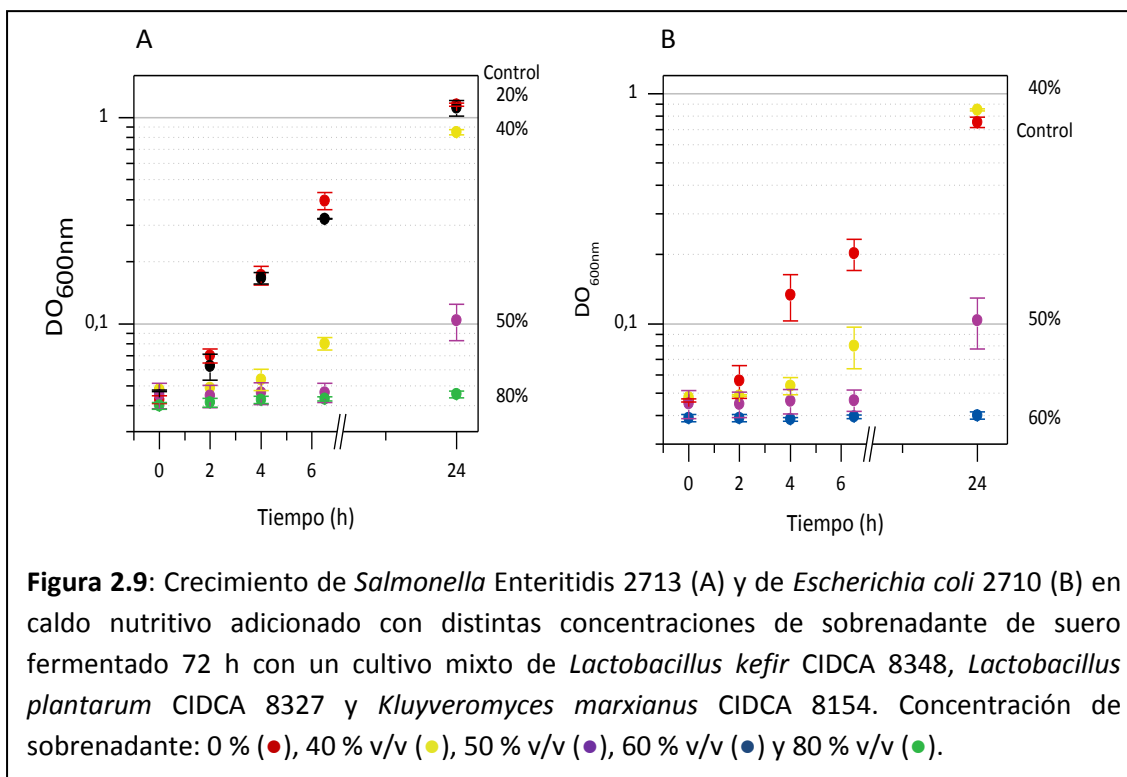


Cuando se cultivó *E. coli* 2710 en caldo nutritivo en presencia de 60 % p/v de este sobrenadante se prolongó la fase de latencia, aunque no se observaron diferencias en la densidad óptica alcanzada en 24 h respecto al control. De manera similar a lo observado para *S. Enteritidis* 2713 el crecimiento prácticamente se detuvo cuando se adicionó al medio de cultivo sobrenadante en concentración 80 % v/v (Figura 2.8 B).

El suero fermentado por esta cepa presenta pH similar al obtenido por fermentación con *L. plantarum*, aunque su composición de ácidos orgánicos es diferente. Este producto contiene ácido láctico (0.13 %), acético (0.15 %), málico y otros 2 ácidos que no pudieron ser identificados en el presente estudio; la combinación de estos ácidos podrían estar implicados en el mayor efecto inhibitorio de esta cepa. Asimismo es probable que otros metabolitos generados por la actividad metabólica de *K. marxianus*, tales como CO<sub>2</sub> y etanol, intervengan en la capacidad inhibitoria.

El producto obtenido por fermentación mixta empleando las tres cepas presentó propiedades inhibitorias potenciadas respecto al fermentado con cepas individuales. Al adicionar el sobrenadante de este producto en concentración 40 % v/v se prolongó 2 h la fase de latencia de *Salmonella* Enteritidis 2713 y de *E. coli* 2710 aunque luego de 24 h la

DO alcanzada fue para ambos patógenos similar a la del control. En medio de cultivo conteniendo 50 % v/v de sobrenadante ambos patógenos fueron incapaces de crecer (Figura 2.9). Esto se halla en concordancia con el mayor contenido de ácidos orgánicos y menor acidez de este producto respecto al obtenido con cepas aisladas (Capítulo 1, Tabla 1.16).



Por lo tanto el producto obtenido de la fermentación de suero con un cultivo mixto de cepas aisladas de kefir demostró un fuerte poder antimicrobiano, inhibiendo por completo el crecimiento de *E. coli* y *Salmonella* Enteritidis aún diluido al 50 %. Estos resultados son interesantes ya que abren la posibilidad de obtener un producto inhibitorio de manera sencilla y controlada reproducible a gran escala.

## CONCLUSIONES

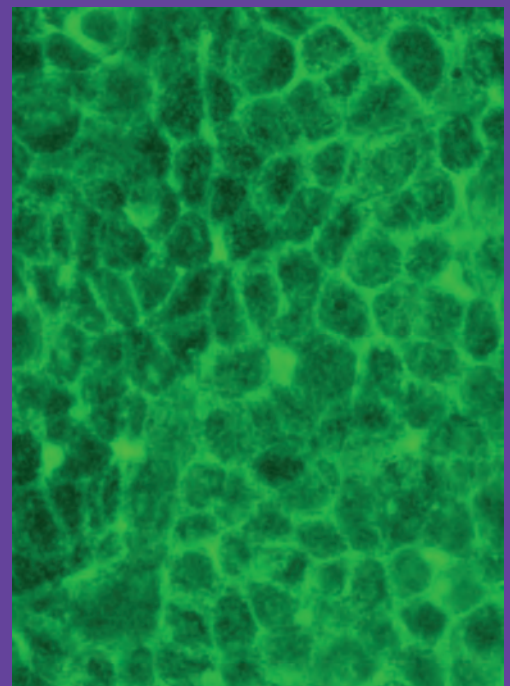
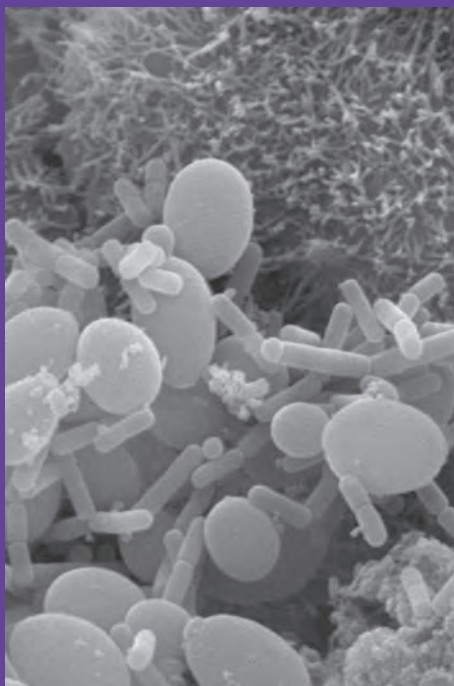
- Al fermentar con gránulos de kefir durante 24 h a 20 °C suero contaminado artificialmente con  $10^5$  UFC/ml de *Salmonella enterica* o  $10^2$  UFC/ml de *Escherichia coli*, los patógenos no se recuperan en el producto.
- Suero bovino en polvo reconstituido o líquido y suero ovino fermentados con gránulos de kefir al 10 % p/v presentan capacidad inhibitoria del crecimiento sobre 100 cepas de *Salmonella enterica* y 100 cepas de *Escherichia coli*. La concentración inhibitoria mínima de estos productos es 30 % para *E. coli* y 30 a 40 % para *S. enterica*.
- Los distintos sueros fermentados con 10 % p/v de gránulos de kefir presentan además efecto bactericida, siendo la concentración bactericida mínima variable de acuerdo a la cepa y al producto fermentado.
- El efecto inhibitorio del suero fermentado no se debe sólo al bajo pH ni a una sustancia termolábil. El ácido láctico no dissociado es uno de los metabolitos responsables de la inhibición.
- El suero fermentado con cultivos madre en suero y en leche, así como el obtenido a partir de gránulos de kefir en concentración 1 % p/v, todos con pH superior a 4, no presentan actividad inhibitoria del crecimiento de *Salmonella enterica* ni de *Escherichia coli*.
- El suero fermentado con *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348, *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327 y *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 inhibe el crecimiento de *Salmonella* Enteritidis y *Escherichia coli*. El producto obtenido por la fermentación conjunta de las tres cepas posee propiedades inhibitorias potenciadas respecto al fermentado con cepas individuales.





**Capítulo 3:** Antagonismo de suero fermentado sobre la adhesión e invasión de *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis en modelos *in vitro* e *in vivo*

---



## INTRODUCCIÓN

La asociación e invasión de *Salmonella* al epitelio intestinal representa un paso crítico para iniciar la infección. Los probióticos pueden interferir en este proceso mediante competencia con los microorganismos patógenos por los sitios de adhesión y los sustratos metabólicos (Servin, 2004). Asimismo pueden inhibir la adhesión del patógeno uniéndose a las células intestinales, bloqueando así los sitios de unión sobre los enterocitos, o formando agregados con los propios patógenos en la luz del intestino (Ouwehand y col., 2002; Collado y col., 2006).

Debido a la dificultad del estudio de la interacción entre probióticos y patógenos *in vivo* se han desarrollado modelos de células epiteliales intestinales *in vitro* que han resultado de utilidad en la dilucidación de estos mecanismos. Empleando células Caco-2 y Caco-2/TC7 se ha demostrado que microorganismos aislados de kefir son capaces de antagonizar la asociación e invasión de *Salmonella enterica* a epitelio intestinal (Santos y col., 2003; Golowczyc y col., 2008). Sin embargo, en estos sistemas simplificados no se considera la interacción con la flora residente, la presencia de mucus, el movimiento peristáltico, entre otros factores que podrían interferir en los resultados (Applegate, 2010). Los antecedentes de estudios *in vivo* del efecto antagónico del kefir sobre *Salmonella* se limitan al trabajo publicado por Zacconi y col. (1995) en el cual se demuestra que la administración de kefir previene la colonización de los ciegos de aves por *Salmonella kedougou*.

En el Capítulo 2 se demostró que el suero fermentado con gránulos de kefir y cepas aisladas de kefir presenta efecto inhibitorio sobre *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis. En este capítulo se propone estudiar el efecto de estos productos sobre la asociación e invasión del patógeno mediante ensayos *in vitro* empleando un modelo de células epiteliales intestinales Caco-2/TC7 y mediante estudios *in vivo* en pollos parrilleros.

## OBJETIVOS

Evaluar el antagonismo del suero fermentado sobre la adhesión e invasión de *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis en modelos *in vitro* e *in vivo* en pollos parrilleros.

### Objetivos particulares

- Caracterizar las propiedades adherentes e invasivas de tres aislados de *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis en el modelo de células epiteliales en cultivo Caco-2/TC7.
- Estudiar el efecto de la interacción de los microorganismos presentes en el suero fermentado con el patógeno en el proceso de asociación e invasión.
- Estudiar la acción de los sobrenadantes de suero fermentado en el proceso de asociación e invasión del patógeno.
- Analizar el efecto de la administración de suero fermentado en la prevención de la colonización intestinal de *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis en pollos parrilleros.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Cultivo de células Caco-2/TC7

La línea celular Caco-2 es un modelo de epitelio intestinal de origen humano proveniente de un adenocarcinoma de colon (ATCC HTB-37) (Fogh y Orfeo, 1977) que exhibe un patrón de diferenciación estructural y funcional característica de los enterocitos, como por ejemplo ribete en cepillo, uniones estrechas funcionales y alto nivel de enzimas asociadas al ribete en cepillo como fosfatasa alcalina, sacarasa isomaltasa y aminopeptidasa (Pinto y col., 1983; Chantret y col., 1994). Las células Caco-2/TC7 son un clon de las células Caco-2 con mayor velocidad de diferenciación. Se utilizaron células de la línea Caco-2-/TC7 (pasaje 23 a 30). Las células se mantuvieron congeladas en nitrógeno líquido en viales conteniendo 1 ml de medio DMEM completo (ver Apéndice) con 5 % de dimetilsulfóxido (Riedel-de Haën AG, D-3016 Seelze, Alemania) como crioprotector. Para reactivarlas se descongeló un vial a 37 °C, se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min para retirar el crioprotector, las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo fresco en una botella de 25 cm<sup>2</sup> (Corning Costar Co., Cambridge, MA, USA) con 4 ml de medio DMEM completo. El cultivo se mantuvo a 37 °C en estufa con atmósfera controlada (5 % CO<sub>2</sub> – 95 % aire) cambiando el medio cada 2 días. A los 7 días se obtuvo una monocapa confluyente y se repicó a una botella de 75 cm<sup>2</sup>. En cada repique la monocapa se observó en un microscopio invertido para verificar su uniformidad y continuidad. Los repiques se realizaron de la siguiente manera: se descartó el medio ya agotado y se lavó la monocapa dos veces con PBS estéril, luego se colocaron 10 ml de solución de tripsina (ver Apéndice) y se llevó a la estufa a 37 °C durante 5 a 8 min. Cuando se observaron los primeros indicios de desprendimiento celular, se levantó la monocapa en 10 ml de DMEM para inactivar la enzima. Se centrifugó a baja velocidad durante 5 minutos, se descartó el medio y se reemplazó por medio DMEM fresco. Se tomaron 50 µl de la suspensión de células y se mezclaron con igual volumen de una solución de azul tripán al 10 % en PBS. Se realizó el recuento de células en una cámara de Neubauer contando sólo aquellas células brillantes (viables).

Se preparó una suspensión de  $2.5 \times 10^5$  células/ml y se sembraron 0.5 ml por fosa en placas de 24 fosas (Corning Costar Co., Cambridge, MA, USA). Las placas con células Caco-2/TC7 se incubaron 7 días (células en confluencia) a 37 °C en una estufa de atmósfera controlada (5 % CO<sub>2</sub> – 95 % aire) cambiando el medio cada 2 días.

## 2. Ensayo de adhesión de microorganismos de kefir a células *in vitro*

Se estudió la adhesión de microorganismos presentes en el suero fermentado con gránulos de kefir y con cepas aisladas de kefir a monocapas de células intestinales de la línea Caco-2/TC7.

Las monocapas fueron lavadas con PBS a temperatura ambiente. A cada fosa se le agregaron 0.5 ml de suspensión microbiana previamente lavada con PBS, resuspendida en DMEM de adhesión (ver Apéndice). Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 1 h en atmósfera controlada (5 % CO<sub>2</sub> – 95 % aire) sin agitación. Luego fueron lavadas 3 veces con PBS para remover los microorganismos no adheridos. Para determinar la concentración de bacterias y levaduras adheridas, a cada fosa se le colocaron 0.5 ml de agua bidestilada estéril y se dejó 1 h a 37 °C para permitir la lisis y desprendimiento de la monocapa. Se tomó todo el volumen de la fosa, se realizaron diluciones apropiadas en triptona 0.1 % y se realizó el recuento de microorganismos viables en MRS agar para bacterias ácido lácticas y en YGC agar para levaduras. Las placas fueron incubadas a 30 °C en aerobiosis durante 72 h. Los resultados se expresaron como porcentaje de adhesión:

$$\% A = (\text{bacterias adheridas/bacterias agregadas a la fosa}) \times 100$$

## 3. Ensayos de asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis a células Caco-2/TC7

Se determinó la capacidad de asociación e invasión de las cepas de *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) CIDCA 101, 2713 y 261D.

*Salmonella* Enteritidis 2713 fue aislada a partir de un pollo parrillero con lesiones típicas de salmonelosis y *Salmonella* Enteritidis 261D a partir de una reproductora COBB de un criadero de Portugal víctima de un episodio de infección por este patógeno. Ambas cepas fueron aisladas y tipificadas en los laboratorios de la empresa de seguridad alimentaria

Controlvet S.A. (Tondela, Portugal). *Salmonella* Enteritidis CIDCA 101 fue aislada de una muestra clínica humana del Hospital de Pediatría Prof. Juan P. Garrahan (Buenos Aires, Argentina).

Las células de la línea Caco-2/TC7 se incubaron 7 días en placas de 24 fosas. Las monocapas fueron lavadas 2 veces con PBS a temperatura ambiente. Se centrifugó un cultivo de *Salmonella* Enteritidis a 5000 x g durante 4 minutos y se resuspendió en PBS. La suspensión se ajustó a una densidad óptica de 0.3 ( $\sim 1 \times 10^8$  UFC/ml) y cuando fue necesario se diluyó 1:100 en PBS ( $\sim 1 \times 10^6$  UFC/ml). Esta suspensión se centrifugó y se resuspendió en DMEM de adhesión. La concentración de *S. Enteritidis* se confirmó mediante recuento de microorganismos viables en placa. A cada fosa se le agregaron 0.5 ml de suspensión de *Salmonella*. Las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C en atmósfera controlada (5 % CO<sub>2</sub> – 95 % aire) sin agitación y luego se lavaron 3 veces con PBS para eliminar las bacterias no asociadas.

Para cuantificar la asociación (bacterias adheridas + internalizadas), a cada fosa se le agregaron 0.5 ml de agua bidestilada estéril y se incubó 1 h a 37 °C. Esto permitió desprender la monocapa. Luego, se tomó todo el volumen de la fosa, se realizaron diluciones en triptona 0.1 % y se plaquearon en agar nutritivo.

Para cuantificar las bacterias internalizadas, aquellas adheridas fueron eliminadas por tratamiento con un antibiótico. Luego la monocapa se lavó 2 veces y se agregaron 0.5 ml de agua bidestilada estéril (1 h a 37 °C) para lisar la monocapa y permitir que las bacterias internalizadas se liberen. Se realizaron diluciones apropiadas en triptona 0.1 % y se llevó a cabo un recuento de microorganismos viables en placas de agar nutritivo. Los resultados se expresaron como UFC/fosa.

Como antibiótico se utilizó gentamicina que tiene la particularidad de que no difunde a través del dominio apical de las células por lo que las bacterias que no se internalizan son afectadas por el antibiótico y las que están internalizadas sobreviven. La sensibilidad a la gentamicina puede variar entre distintas cepas de *Salmonella*. Se evaluó, por lo tanto, la concentración de antibiótico adecuada para las cepas de *Salmonella* Enteritidis empleadas en este estudio.

Para esto se preparó una suspensión de *S. Enteritidis* en PBS con una concentración  $10^6$  UFC/ml. La suspensión se fraccionó en tubos estériles y a cada uno se le agregó gentamicina (Droguería Gatti, La Plata, Argentina) en concentraciones finales crecientes desde 100 hasta 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Luego de 1 y 2 h de incubación a 37 °C se analizó la concentración de *Salmonella* mediante recuento de microorganismos viables en agar nutritivo, retirándose previamente el sobrenadante conteniendo el antibiótico por centrifugación y lavado con PBS. A partir de estos resultados se determinó la concentración de gentamicina y el tiempo de incubación que resultan bactericidas.

#### **4. Efecto de los microorganismos de kefir sobre la asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis a células Caco-2/TC7**

##### **4.1. Preincubación de la monocapa celular con microorganismos de kefir**

Mediante este ensayo se evaluó el efecto de la preincubación de la monocapa de enterocitos con microorganismos de kefir sobre la asociación e invasión de *S. Enteritidis*. Para ello, suero fermentado con gránulos de kefir o con *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348, *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327 y *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 en cultivo mixto (ver Materiales y métodos del capítulo 1, secciones 2 y 3.3 respectivamente), se centrifugó a 13000 x g durante 15 min, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó 2 veces con PBS y se resuspendió en DMEM de adhesión.

Se utilizaron placas de 24 fosas con células Caco-2/TC7. Las fosas se lavaron 2 veces con PBS para eliminar el medio de cultivo. A cada fosa se le agregaron 0.5 ml de la suspensión de microorganismos de kefir. Las placas se incubaron 1 h a 37 °C en atmósfera controlada (5 %  $\text{CO}_2$  – 95 % aire). Luego, se lavaron 3 veces para eliminar los microorganismos no adheridos. A las fosas preincubadas con los microorganismos de kefir se les agregaron 0.5 ml de una suspensión de *Salmonella* Enteritidis en DMEM de adhesión y se incubaron nuevamente durante 1 h a 37 °C en atmósfera controlada (5 %  $\text{CO}_2$  – 95 % aire). La cantidad de *Salmonella* agregada a cada fosa fue de aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC o  $1 \times 10^6$  UFC dependiendo del ensayo. Luego de la incubación, se determinó el número de bacterias

asociadas e internalizadas como se explicó en la sección 3. Simultáneamente se realizaron controles de la asociación e invasión de *S. Enterica* realizando el mismo ensayo en ausencia de microorganismos de kefir.

#### **4.2. Preincubación de *Salmonella* Enteritidis con microorganismos de kefir**

Se preparó una suspensión de microorganismos de kefir en PBS. Para ello, 10 ml de suero fermentado con gránulos de kefir o con *L. kefir* CIDCA 8348, *L. plantarum* CIDCA 8327 y *K. marxianus* CIDCA 8154 en cultivo mixto, se centrifugaron a 13000 x g durante 15 min, se descartó el sobrenadante, el pellet se lavó 2 veces con PBS y se resuspendió en 10 ml o en 1 ml (suspensión concentrada 10 veces) de PBS. Se preparó una suspensión de *Salmonella* en PBS como se detalló en la sección 3.

Se preincubó 1 ml de la suspensión de microorganismos de kefir con 1 ml de la suspensión de *S. Enteritidis* durante 1 h a 37 °C. Luego 0.4 ml de la mezcla y 0.4 ml de DMEM de adhesión fueron adicionados a la placa de células Caco-2/TC7 y se incubaron durante 1 h a 37 °C en atmósfera controlada (5 % CO<sub>2</sub> – 95 % aire). Luego de lavar las fosas 3 veces, se cuantificó *Salmonella* asociada e internalizada como se explicó anteriormente (sección 3). Como control, 1 ml de suspensión de *Salmonella* se preincubó con 1 ml de PBS sin microorganismos de kefir a 37 °C y se realizó el mismo ensayo.

#### **4.3. Preincubación de *Salmonella* Enteritidis con sobrenadantes de suero fermentado**

Se realizó una preincubación de *Salmonella* Enteritidis con sobrenadantes de suero fermentado con gránulos de kefir y con las cepas aisladas de kefir. Para esto, un cultivo de 18 h del patógeno se centrifugó (5000 x g, 4 min) y el pellet se resuspendió en igual volumen de sobrenadante libre de microorganismos. Luego, se incubó a 37 °C durante 1 h. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó y se resuspendió en DMEM de adhesión. Se realizó el ensayo de asociación e invasión como se indicó en la sección 3.



## 5. Técnicas de microscopía

Las células Caco-2/TC7 se sembraron en placas de 24 fosas sobre portaobjetos de vidrio (Assistent, Alemania). Estos vidrios fueron previamente lavados con agua y detergente no iónico (Extran MAO2 neutro, Merck, Darmstadt, Alemania) y luego de un enjuague exhaustivo con agua destilada, se colocaron en cajas de petri y se esterilizaron en autoclave. Se realizaron ensayos de infección con *Salmonella* Enteritidis CIDCA 101 sin tratar y preincubada con microorganismos o con sobrenadantes de suero fermentado mediante las metodologías descritas en las secciones 4.2 y 4.3. Luego las muestras fueron preparadas para distintas observaciones microscópicas mediante las técnicas descritas a continuación.

### 5.1. Tinción de May Grünwald Giemsa

Las muestras se lavaron 3 veces con PBS y fijaron con etanol absoluto durante 5 minutos a 4 °C. A continuación, se repitió el lavado con PBS para quitar el fijador, se agregaron 0.5 ml de solución de colorante May Grünwald (Lab. Biopur, Argentina) a cada fosa y se dejó actuar el colorante durante 3 min. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se añadió el colorante Giemsa diluido 1/10, se incubó durante 20 min y luego cada fosa se lavó 3 veces con PBS. Luego se montaron los vidrios invertidos sobre 7 µl de glicerol 50 % en PBS con 0.1 % de azida de sodio y se sellaron para su observación en microscopio óptico. Para su observación se utilizó un microscopio de campo claro DMLB acoplado a una cámara DC 100 (Leica Microscopy Systems Ltd., Heerbrugg, Suiza).

### 5.2. Marcación fluorescente del citoesqueleto con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC).

Las muestras se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron durante 2 min con paraformaldehído 3 % p/v en PBS. Las muestras se trataron durante 10 min con NH<sub>4</sub>Cl 50 mM para bloquear las funciones aldehído libres. Luego fueron permeabilizadas mediante tratamiento durante 4 min con 0.2 % de Triton X -100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), se agregó PBS y se incubó durante 10 min. Este último paso fue repetido y luego las células fueron tratadas durante 10 min con 0.2 % de gelatina en PBS. Se extrajo completamente el buffer y se agregaron a cada fosa 20 µl de faloidina fluorescente (Sigma Chemical, St. Louis, USA) en

concentración 0.5 µg/ml en PBS-gelatina. Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 45 min en cámara húmeda y al abrigo de la luz. Luego fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas durante 10 minutos en PBS-gelatina. Los vidrios fueron retirados de las fosas, escurridos y montados invertidos sobre 7 µl de glicerol 50 % en PBS con 0.1 % de azida de sodio. Las muestras fueron conservadas en oscuridad hasta su observación en un microscopio invertido de fluorescencia Nikon TI-Eclipse en combinación con un software de procesamiento de imágenes NIS-elements.

### **5.3. Microscopía electrónica de barrido**

Las muestras se lavaron 3 veces con PBS, se fijaron con glutaraldeído (Riedel de Haën, Seelze, Alemania) 1 % v/v durante 2 h a 4 °C, se lavaron nuevamente con PBS y se deshidrataron en soluciones crecientes de etanol absoluto (20, 50, 70, 90 y 100 %) en PBS, colocándose las muestras 20 min en cada concentración. Finalmente, las muestras fueron deshidratadas por punto crítico usando CO<sub>2</sub> líquido (Baltec CP-30), metalizadas por el método de pulverización catódica en un metalizador Balzers y examinadas empleando un microscopio electrónico de barrido Philips SEM 505 que cuenta con un programa para la obtención de imágenes digitales (Digitalizador de Imagen Soft Imaging System ADDA II (SIS)).

## **6. Ensayos *in vivo***

### **6.1 Animales de laboratorio y bioterios**

Se emplearon pollos parrilleros raza Ross pm3 de 10 a 16 días de edad según el ensayo. Los mismos se dividieron en grupos de 6 individuos cada uno, que fueron distribuidos en 2 bioterios con un máximo de 2 grupos por bioterio por cada ensayo.

Los bioterios consistieron en salas de 3.7 x 3 m equipados con acondicionamiento térmico, ingreso de aire forzado y conductos de extracción, pisos presala con abertura de puertas hacia el exterior (P-) y sala con abertura de puertas hacia el interior (P+), así como pisos y paredes cubiertas con pinturas resistentes a desinfecciones. Los mismos fueron certificados por la Dirección General de Veterinaria de Portugal (Largo da Academia Nacional de Belas Artes N° 2, 1249-105 LISBOA).

Se emplearon jaulas individuales de 62 cm de ancho, 38 cm de largo y 50 cm de alto con bebederos y comederos propios (Figura 3.1). Los pollos se mantuvieron con iluminación fría fluorescente continua, a una temperatura de  $24.8 \pm 1.3$  °C y una humedad ambiente relativa de  $56 \pm 8$  %. La temperatura y humedad relativa se verificó diariamente. Antes de comenzar cada ensayo los animales se mantuvieron durante 3 días en los bioterios para su aclimatación. Los pollos consumieron alimento balanceado y agua *ad libitum*.



**Figura 3.1:** Fotografía de las jaulas empleadas con comederos y bebederos individuales.

## 6.2 Productos administrados

En distintos ensayos se evaluó la administración de los siguientes productos:

- **Suero fermentado con gránulos de kefir (SFG):** se obtuvo de acuerdo a la metodología descrita en Materiales y métodos del Capítulo 1, sección 2. Su contenido de BAL fue de  $\sim 10^7$  UFC/ml y su contenido de levaduras de  $\sim 10^6$  UFC/ml (Capítulo 1, Tabla 1.8), su composición química se presentó en el Capítulo 1 (Tabla 1.11, suero bovino en polvo).

- **Suero fermentado empleando cultivo madre en suero (SFC):** se obtuvo según la metodología detallada Materiales y métodos del Capítulo 1, sección 3.1.1. El objeto de administrar este producto fue aumentar la cantidad de probióticos suministrada ya que su contenido de BAL es de aproximadamente  $10^8$  UFC/ml y el de levaduras  $10^7$  UFC/ml (Capítulo 1, Tabla 1.14).
- **Microorganismos presentes en suero fermentado con cultivo madre en suero, resuspendidos en solución fisiológica (MSF):** el suero fermentado con cultivo madre en suero se centrifugó durante 10 min a 10000 x g. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en el mismo volumen inicial de solución fisiológica.

### 6.3 Preparación del inóculo del patógeno

Para los ensayos *in vivo* se utilizó *Salmonella enterica* serovar Enteritidis 261D. El patógeno se inoculó en agua peptonada tamponada (ver Apéndice) y se incubó a 37 °C. A distintos tiempos se tomaron alícuotas, se midió la densidad óptica (DO) y la concentración de microorganismos viables mediante recuento en placa. A partir de los resultados obtenidos se graficó la DO en función de la concentración de microorganismos viables y los valores se ajustaron a una recta. La ecuación de dicha recta se utilizó durante los ensayos para calcular la concentración de *Salmonella* Enteritidis en el inóculo a partir de la DO del cultivo. La concentración de microorganismos viables del inóculo se determinó luego mediante recuento en placa.

### 6.4 Protocolos experimentales

Los experimentos fueron diseñados de acuerdo con las pautas del Consejo Directivo Europeo (86/609/EEC del 24 de noviembre de 1986) considerando las regulaciones y las provisiones administrativas de los estados miembro con respecto a la protección de los animales usados con fines experimentales u otros propósitos científicos.

Todos los análisis fueron llevados a cabo de acuerdo con las recomendaciones para el bienestar animal de la Federación de Asociaciones Europea de las Ciencias del Animal de

Laboratorio (FELASA) y fueron autorizados por la Dirección General de Veterinaria de Portugal (Largo da Academia Nacional de Belas Artes N° 2, 1249-105 LISBOA).

**Ensayo 1.** La finalidad de este ensayo fue analizar la inocuidad dos productos con distinta concentración de probióticos: suero fermentado con gránulos (SFG) y con cultivo madre en suero en presencia (SFC) o ausencia (MSF) de sobrenadante. Este sobrenadante contiene los productos del metabolismo microbiano.

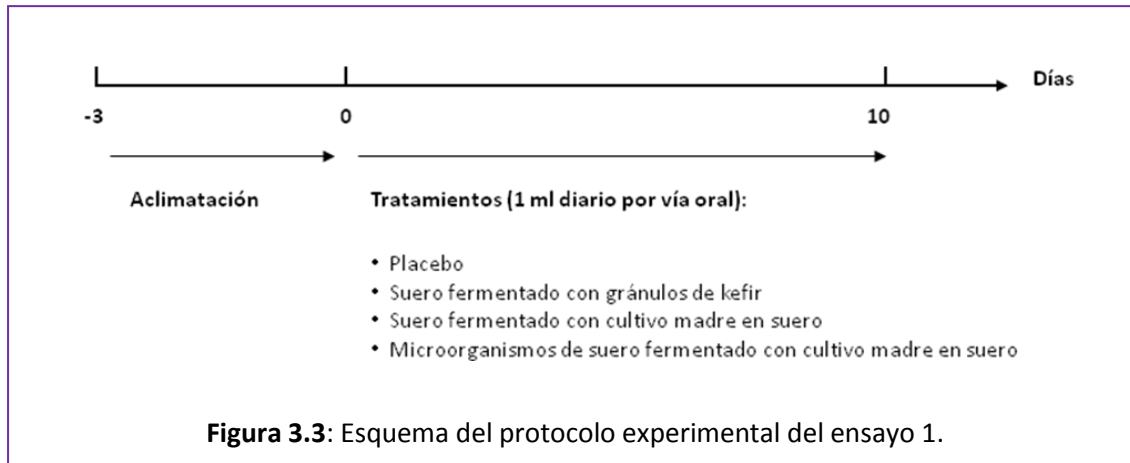
Se realizaron por lo tanto 4 tratamientos mediante la administración de:

1. Agua como placebo (control).
2. Suero fermentado con gránulos de kefir (BAL  $1 \times 10^7$  UFC/ml, levaduras  $4 \times 10^6$  UFC/ml).
3. Suero fermentado con cultivo madre en suero (BAL  $1 \times 10^8$  UFC/ml, levaduras  $1 \times 10^7$  UFC/ml).
4. Microorganismos de suero fermentado con cultivo madre en suero (BAL  $1 \times 10^8$  UFC/ml, levaduras  $1 \times 10^7$  UFC/ml).

Luego de 3 días de aclimatación de las aves a las condiciones del bioterio, los productos fueron administrados en una dosis diaria de 1 ml por individuo por vía oral en el pico de cada individuo empleando una micropipeta (Figura 3.2) durante 10 días consecutivos (Figura 3.3).



**Figura 3.2:** Fotografía que muestra el modo de administración oral de los probióticos.

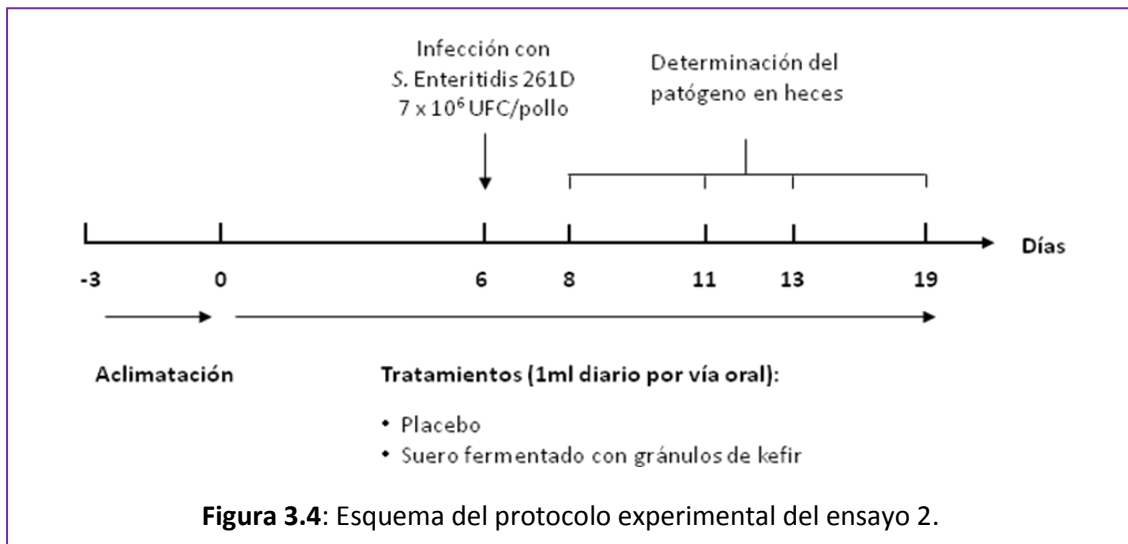


Durante el período de administración se registró diariamente el consumo de agua, el consumo de alimento, la humedad de las heces y el peso de cada animal. Al inicio de las mediciones la edad de los individuos fue 14 días. El agua de cada bebedero se renovó diariamente. Para determinar la humedad de las heces se recolectó diariamente la totalidad de la materia fecal de cada individuo, se homogeneizó, se tomó una muestra de 5 g y se midió la humedad en un analizador de humedad Sartorius MA 150 (Data Weighing Systems, Elk Grove, IL, EEUU).

**Ensayo 2.** La finalidad de este ensayo fue evaluar la capacidad del suero fermentado con gránulos de kefir (SFG), administrado en una dosis diaria de 1 ml por individuo, de disminuir la colonización intestinal de *S. Enteritidis* 261D inoculada en una dosis única de  $10^6$  UFC/ml. Para esto se emplearon pollos de 13 días de edad que fueron sometidos a los tratamientos:

1. Control sin infectar
2. Control de infección
3. Suero fermentado con gránulos / infectado

Los individuos del grupo tratado con probiótico recibieron **una dosis diaria definida** de 1 ml de suero fermentado por vía oral. El probiótico se administró durante 6 días antes de inocular el patógeno y se continuó suministrando hasta el final del ensayo. Aquellos grupos que fueron infectados con el patógeno se inocularon el día 6 del ensayo con una dosis única de 1 ml de *S. Enteritidis* 261D en concentración  $7 \times 10^6$  UFC/ml (Figura 3.4).



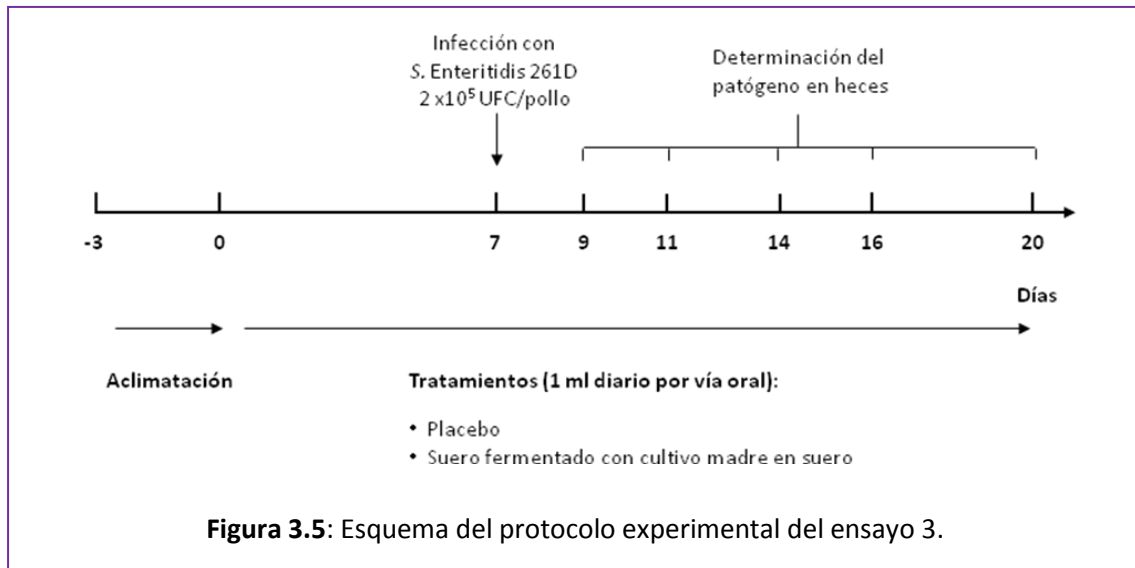
A partir del día siguiente al inicio de la administración de los tratamientos se registraron diariamente el consumo de agua, el consumo de alimento y el peso de cada animal durante 18 días consecutivos. El contenido de *Salmonella* en heces se analizó los días 2, 5, 7, 10 y 13 luego de la infección. El día 13 después de la infección los pollos fueron sacrificados con isofluorano y se determinó si hubo translocación del patógeno a bazo e hígado.

**Ensayo 3.** La finalidad de este ensayo fue evaluar la capacidad del suero fermentado con cultivo madre en suero, administrado en **una dosis diaria definida** de 1 ml por individuo, de disminuir la colonización intestinal de *Salmonella* Enteritidis 261D inoculada en dosis de  $10^5$  UFC/ml.

Para esto se emplearon pollos de 10 días de edad que fueron sometidos a 3 tratamientos:

1. Control sin infectar
2. Control de infección
3. Suero fermentado con cultivo madre en suero / infectado

Los individuos del grupo tratado con probiótico (3) recibieron una dosis diaria de 1 ml de suero fermentado con cultivo madre en suero por vía oral. El probiótico se administró durante 7 días antes de inocularse el patógeno y se continuó suministrando hasta el final del ensayo. Aquellos grupos que fueron infectados con patógeno se inocularon el día 7 del ensayo con una dosis única de 1 ml de *S. Enteritidis* 261D en concentración  $2 \times 10^5$  UFC/ml (Figura 3.5).



Diariamente se registró el consumo de agua, el consumo de alimento y el peso de cada animal durante 20 días consecutivos. El contenido de *Salmonella* en heces se analizó los días 2, 4, 7, 9 y 13 luego de la infección. El día 20 luego de la infección los pollos fueron sacrificados con isoflurano y se determinó si hubo translocación del patógeno a bazo e hígado.

**Ensayo 4.** Este ensayo se llevó a cabo a fin de evaluar el efecto de la administración *ad libitum* en el agua de bebida de suero fermentado con cultivo madre en suero o de sus microorganismos sobre la colonización intestinal de *S. Enteritidis* 261D inoculada en dosis  $2 \times 10^5$  UFC/ml.

Para esto se emplearon pollos de 16 días de edad que fueron sometidos a 3 tratamientos:

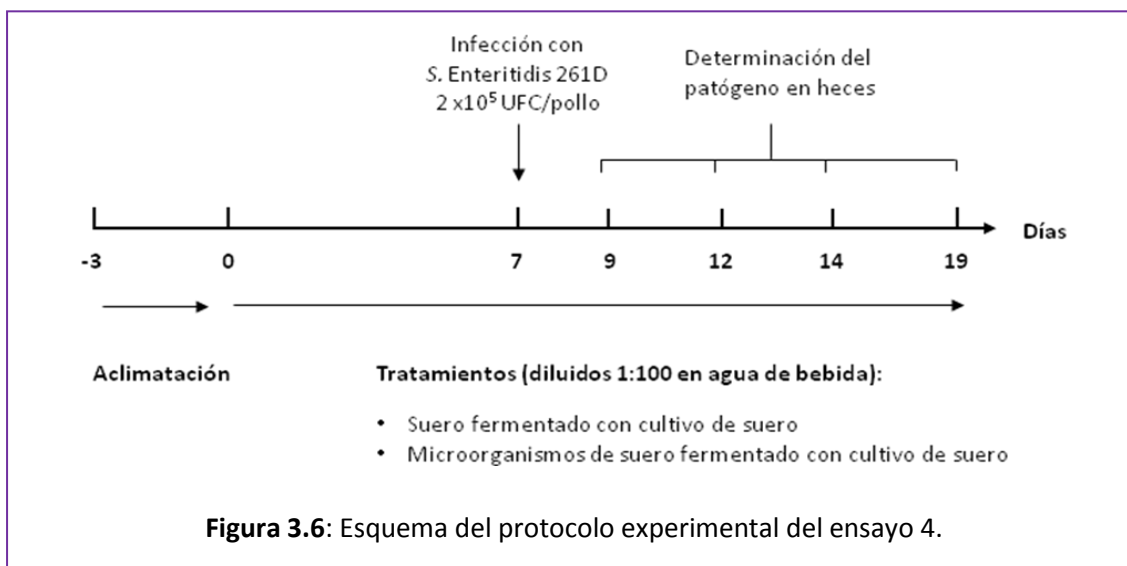
1. Control de infección
2. Suero fermentado con cultivo de suero en el agua de bebida / infectado
3. Microorganismos de suero fermentado con cultivo en suero en agua de bebida / infectado

Al grupo 2 se le administró el suero fermentado con cultivo madre en suero diluido 1:100 en el agua de bebida. Al grupo 3 sólo los microorganismos de este producto suspendidos en solución fisiológica también en dilución 1:100. El agua de bebida con los correspondientes tratamientos se renovó diariamente.



Previamente al inicio del ensayo se estudió la supervivencia de los microorganismos en agua mediante recuento de bacterias lácticas y levaduras viables inmediatamente después de la dilución (1:100) y luego de 24 h de incubación a 25 °C. Durante el desarrollo del ensayo se realizaron controles de pH y del contenido de microorganismos viables en el agua de los bebederos de los grupos 2 y 3.

Todos los grupos fueron desafiados con una dosis de 1 ml de *S. Enteritidis* 261D en concentración  $2 \times 10^5$  UFC/ml el día 7 del ensayo (Figura 3.6).



Se realizaron mediciones diarias de peso, consumo de alimento y consumo de agua de cada individuo durante 18 días a partir del inicio de la administración de los tratamientos. Se analizó el contenido de *Salmonella* en heces los días 2, 5, 7, 10 y 12 luego de la infección con el patógeno. El día 19 de ensayo los pollos fueron sacrificados y se determinó si hubo translocación del patógeno a bazo e hígado.

### 6.5 Translocación de *Salmonella* Enteritidis a bazo e hígado

A cada individuo se le extirparon el bazo y el hígado en condiciones asépticas. La presencia de *Salmonella* fue determinada de acuerdo a la norma ISO 6579:2003/A1:2007 (Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. en heces de animales y muestras ambientales en la etapa de producción primaria).

Los órganos fueron pesados, diluidos 1:10 en agua peptonada tamponada y triturados en un Stomacher (Seward Medical, modelo 400, U.K.). Se realizó un enriquecimiento durante 24 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo se sembraron 3 gotas de este cultivo separadas formando un triángulo sobre placas de Petri con medio semisólido Rappaport-Vassiliadis Modificado (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Las placas se incubaron durante 24 h a 41.5 °C. Se consideraron positivos aquellos tratamientos para los cuales las colonias correspondientes a cada punto de siembra crecieron hacia el centro hasta superponerse.

#### **6.6. Determinación del contenido de *Salmonella* en heces**

Veinticuatro horas antes de la recolección de las muestras se limpió el piso de cada jaula. Transcurrido este tiempo se recolectaron las heces de cada individuo, se homogeneizaron y se tomó una muestra de 5 g. Se realizaron diluciones en triptona 0.1 %, se plaquearon en el medio de cultivo selectivo y diferencial RAPID-*Salmonella* agar (BIO-RAD, Paris, France) y las colonias magenta se contaron luego de 24 h de incubación a 37 °C.

#### **6.7. Análisis de la microbiota intestinal por electroforesis en gel con gradiente desnaturizante**

A fin de analizar los cambios en la microbiota intestinal por la administración de suero fermentado con gránulos de kefir, se tomaron muestras del íleon de 6 individuos luego de ser tratados por administración de una dosis diaria de 1 ml por vía oral durante 10 días y de 6 individuos que no consumieron este producto (ver protocolo experimental en la sección 3.4, ensayo 1). Los pollos fueron sacrificados y se realizó una incisión longitudinal de la porción distal del intestino delgado, antes de la desembocadura de los ciegos. La superficie se enjuagó suavemente con buffer fosfato esterilizado por filtración para retirar los restos de contenido luminal. Luego el epitelio de 5 cm de intestino se raspó con una espátula estéril recogiendo el mucus con las bacterias adheridas al epitelio. Se extrajo ADN a partir de 200 µl de estas muestras empleando el kit comercial High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Sistemas de Diagnósticos, Lda.).

Las muestras fueron amplificadas empleando los primers universales 338fGC y 518r para Eubacterias mediante la metodología descrita en el capítulo 1 (Materiales y métodos, sección 10). Asimismo se utilizaron los *primers* Lac 1 (5'-AGCAGTAGGGAAT CTTCCA-3') y GC-Lac2 (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGCCCGGGGGCACCGGGGGATTYCACCGCTACAC ATG-3') que amplifican una región de 430 pb del ADNr 16S de *Lactobacillus* sp. El programa de amplificación empleado fue: 2 min de desnaturalización, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 61 °C por 1 min y 68 °C por 1 min; y elongación final a 68 °C por 7 min (Walter y col., 2001).

Los productos PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa (10 g/l) conteniendo bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV. Luego se analizaron en geles de acrilamida con gradiente desnaturalizante de urea formamida 40-60 % según lo descrito en el capítulo 1 (Materiales y métodos, sección 11).

Para comparar los perfiles DGGE de distintos individuos se consideraron las bandas como caracteres y a su presencia o ausencia como el estado de estos caracteres. La similitud entre perfiles se calculó mediante el coeficiente de Jaccard y el agrupamiento se llevó a cabo mediante el método de ligamiento promedio no ponderado (UPGMA) empleando el programa SYSTAT versión 12. Los resultados se presentaron en forma de dendrograma.

### 6.8. Análisis estadístico

En los ensayos *in vitro* los tratamientos se realizaron por triplicado (3 fosas) en 2 o 3 ensayos independientes. Los resultados se compararon luego mediante el test T de Student ( $\alpha=0.05$ ).

En los ensayos *in vivo* las diferencias entre tratamientos en cuanto al consumo de alimento, el consumo de agua, la ganancia de peso y la conversión alimentaria fueron evaluadas mediante análisis de la varianza (ANOVA). Para analizar la concentración de *Salmonella* en heces se aplicó una transformación logarítmica a fin de normalizar los datos y los mismos se compararon mediante el Test T de Student ( $\alpha=0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### PARTE A: Antagonismo de suero fermentado sobre la adhesión e invasión de *Salmonella* Enteritidis en modelos *in vitro*

Utilizando el modelo de células de epitelio intestinal Caco-2/TC7 se analizó la capacidad de asociación e invasión de distintos aislados de *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) y la capacidad de adhesión de los microorganismos de kefir presentes en distintos sueros fermentados. Se evaluó luego el efecto antagónico de los microorganismos de los sueros fermentados y de sus sobrenadantes sobre la asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis a epitelio intestinal.

#### 1. Asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis a células Caco-2/TC7

Se analizó en una primera etapa, la capacidad de distintas cepas de *Salmonella* Enteritidis de adherirse e invadir (internalizar) células Caco-2/TC7 en cultivo. Para los estudios de asociación a las células se realizó un recuento del total de bacterias (adheridas + internalizadas), mientras que para determinar el nivel de invasión fue necesario diferenciar las bacterias adheridas de las que se encontraban dentro de las células utilizando gentamicina.

Se evaluaron la concentración de antibiótico y el tiempo de incubación adecuados para las cepas de *Salmonella* Enteritidis empleadas en este estudio: 2713, 261D y CIDCA 101. La viabilidad de las 3 cepas en presencia 100 µg/ml de gentamicina disminuyó aproximadamente 4 órdenes logarítmicos durante 1 h de incubación, considerándose este tratamiento apropiado para los estudios de invasión. Otros autores han utilizado 100 µg/ml de gentamicina durante 1 h en estudios de invasión de *Salmonella* a células Caco-2 (Mynott y col., 2002; Golowczyc y col., 2007).

Se analizó la asociación e invasión de 3 cepas de *Salmonella* Enteritidis empleando una dosis infectiva de patógeno de  $10^8$  UFC/fosa, lo que representa una multiplicidad de infección (mdi) de 100 bacterias por cada célula epitelial. Se hallaron porcentajes de asociación distintos para las 3 cepas con valores entre 0.3 y 6 %, mientras que los

porcentajes de invasión para las cepas CIDCA 101 y 2713 fueron similares con valores de ~ 0.1 % (Tabla 3.1).

Cuando se infectaron las células Caco-2/TC7 con  $10^6$  UFC/fosa de *S. Enteritidis* CIDCA 101 (mdi=1) se obtuvieron porcentajes de asociación e invasión similares a los obtenidos al aplicar una dosis infectiva de  $10^8$  UFC/fosa (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1:** Asociación (adhesión + invasión) e invasión de distintas cepas de *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis a monocapas de células Caco-2/TC7.

Cepa	Inóculo	Asociación		Invasión	
	(UFC/fosa)	(UFC/fosa)	(%)	(UFC/fosa)	(%)
2713	$1.0 \pm 0.1 \times 10^8$	$1.0 \pm 0.9 \times 10^6$	1.0	$1.1 \pm 0.6 \times 10^5$	0.11
261D	$1.1 \pm 0.5 \times 10^8$	$3.9 \pm 2.3 \times 10^5$	0.3	ND*	ND
CIDCA 101	$0.8 \pm 0.2 \times 10^8$	$4.4 \pm 0.4 \times 10^6$	5.5	$0.9 \pm 0.3 \times 10^5$	0.11
CIDCA 101	$1.1 \pm 0.2 \times 10^6$	$6.6 \pm 2.1 \times 10^4$	6.0	$9.4 \pm 2.9 \times 10^3$	0.09

Los valores corresponden al promedio de cuatro ensayos independientes.

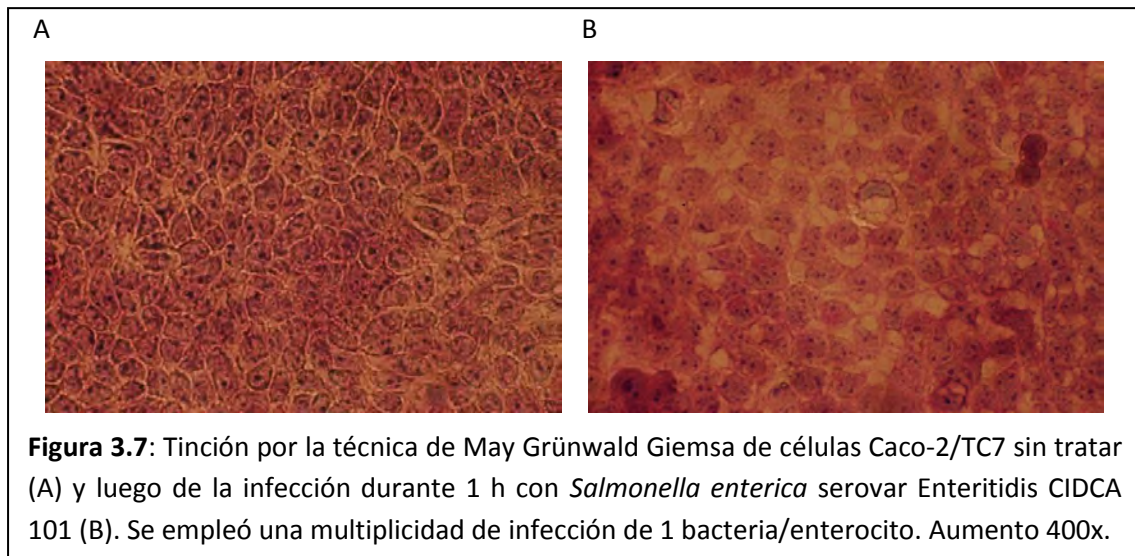
\*ND: no determinado

El porcentaje de asociación e invasión de *S. Enteritidis* CIDCA 101 hallado en el presente trabajo se corresponde con el informado previamente por Golowczyc y col. (2007). Estos autores describieron que la asociación de esta cepa a células Caco-2/TC7 es 6.5 % y la invasión de 0.11 %.

Asimismo otros autores han informado valores de asociación e invasión de *Salmonella* variables entre cepas, similares a los hallados en el presente trabajo. Yim y col. (2010) describieron valores de asociación a células Caco-2 de 30 cepas de *Salmonella* Enteritidis entre 0.99 y 3.45 % y de invasión entre 0.02 y 1.10 %. Shah y col. (2011) hallaron que la capacidad de invadir células Caco-2 de 55 cepas de *Salmonella* Enteritidis aisladas de aves era variable, encontrando que de las cepas evaluadas, 30 presentaron capacidad invasiva alta (~ 0.6 %), 18 intermedia (~ 0.1 %), y 7 baja (~ 0.05 %). Considerando la clasificación descrita por estos autores la capacidad invasiva de las cepas 2713 y CIDCA 101 evaluada en el presente trabajo fue intermedia.

La asociación de *Salmonella* a las células epiteliales es un paso crucial para iniciar la infección. Este patógeno establece un estrecho contacto con el borde en cepillo del epitelio

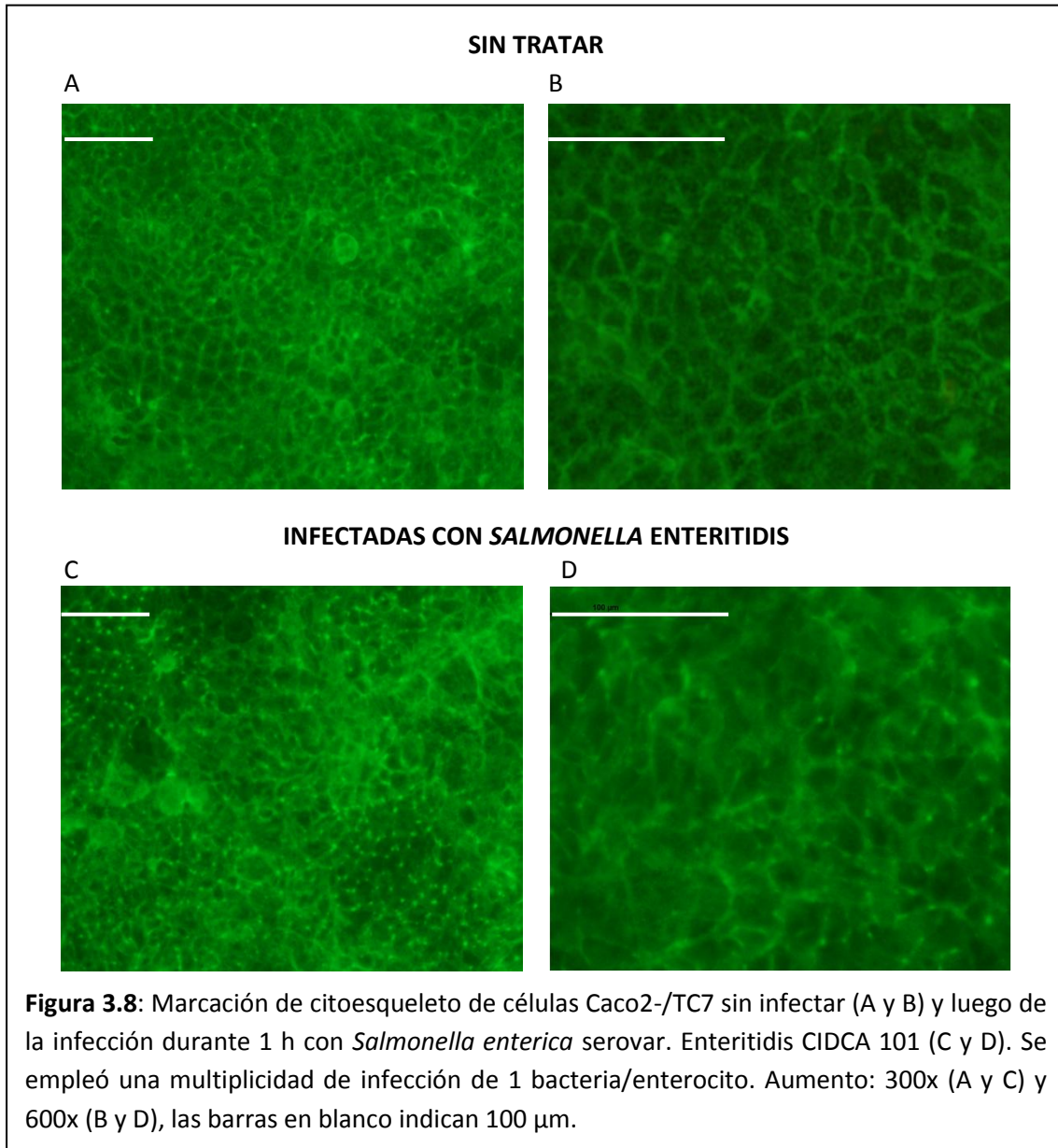
intestinal, cuando la bacteria se acerca a la superficie epitelial, las microvellosidades circundantes empiezan a degenerarse con elongación, edema y crecimiento en un proceso llamado ruffling (rizado). Aquí, los efectores interactúan con las proteínas de la célula hospedera para reorganizar el citoesqueleto de actina e inducir cambios morfológicos que causan que estas células, normalmente no fagocíticas, internalicen la bacteria en un proceso llamado invasión. Mediante el empleo de técnicas microscópicas pudieron estudiarse las alteraciones causadas por el patógeno a células Caco-2 luego de la infección. El aspecto de la monocapa de células Caco-2/TC7 sin tratar (control) y de células infectadas con *Salmonella* Enteritidis se observó mediante tinción de May Grünwald Giemsa. En la Figura 3.7 A se puede observar que las células sin infectar presentan la forma poliédrica típica de esta línea celular, se encuentran unidas entre sí y con un aspecto uniforme. Por el contrario, cuando las células son infectadas durante 1 h con *Salmonella* Enteritidis (dosis de infección  $1 \times 10^6$  UFC/ml) se redondean y pierden su forma poliédrica característica (Figura 3.7 B).



Se ha descrito que luego de la entrada de *Salmonella* a los enterocitos las bacterias internalizadas en vacuolas membranosas son rodeadas por estructuras densas de 5-10  $\mu\text{m}$  conformadas por varios componentes del citoesqueleto. Estas estructuras consisten en agregados de actina polimerizada,  $\alpha$ -actina y tropomiosina sobre y a los costados de la bacteria invasora y son evidentes luego de la adición de la bacteria patógena a células

epiteliales en cultivo, siendo detectadas luego de 20 a 60 min de incubación dependiendo de modelo de células empleado (Finlay y col., 1991).

A fin de estudiar las modificaciones en el citoesqueleto de las células Caco-2/TC7 luego de su infección con *Salmonella*, se marcó la red de filamentos de actina del citoesqueleto a través de la utilización de faloidina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-faloidina) que presenta alta afinidad por esta estructura.

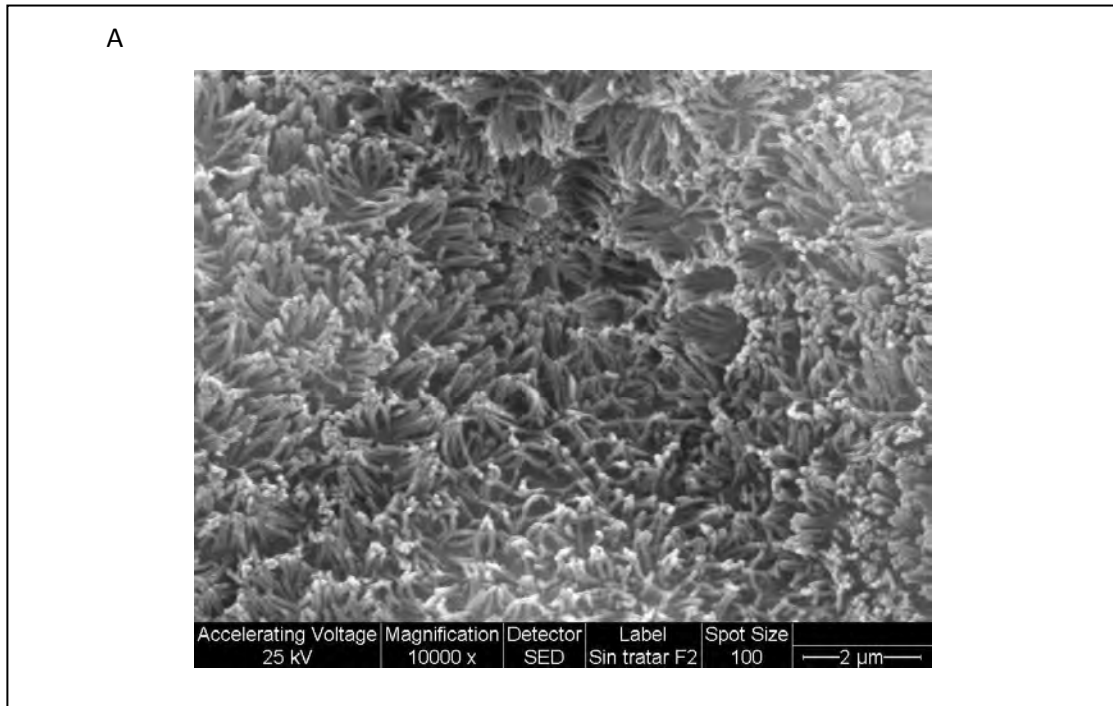


En las células sin infectar la actina se distribuyó de modo uniforme en los bordes de las células y en las microvellosidades, asimismo se observó un patrón continuo de contacto

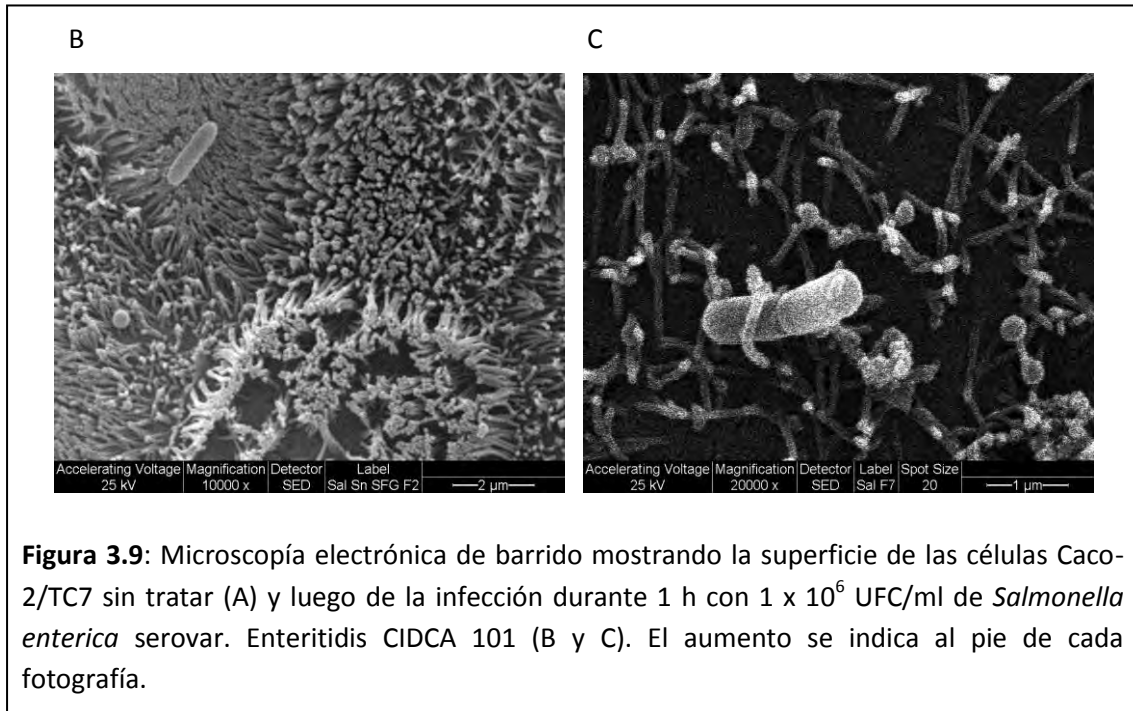


entre las células (Figura 3.8 A y B). Las células infectadas no presentaron una notoria alteración de la estructura del citoesqueleto, sin embargo en algunas zonas de la monocapa se observó una distribución menos homogénea de la actina y mayor concentración de la misma en los contactos entre células (Figura 3.8 C y D).

Por microscopía electrónica de barrido se observó la apariencia de la monocapa de células epiteliales sin infectar y luego de ser tratadas con el patógeno (Figura 3.9). Las células intestinales infectadas con *Salmonella* mostraron una clara desorganización de las microvellosidades en las proximidades de las zonas a las que se asoció el patógeno (Figura 3.9 B) observándose asimismo la degeneración y elongación de las mismas para rodear la bacteria invasora (Figura 3.9 C).







**Figura 3.9:** Microscopía electrónica de barrido mostrando la superficie de las células Caco-2/TC7 sin tratar (A) y luego de la infección durante 1 h con  $1 \times 10^6$  UFC/ml de *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis CIDCA 101 (B y C). El aumento se indica al pie de cada fotografía.

## 2. Adhesión de los microorganismos de kefir a células Caco2/TC7

Es generalmente aceptado que una característica para seleccionar cepas probióticas es su capacidad de adherirse al epitelio intestinal. Esto les permite un mayor tiempo de residencia en el tracto gastrointestinal y mayor posibilidad de ejercer efectos inmunomodulatorios e inhibir la adhesión de patógenos al epitelio intestinal (Fernandez y col., 2003; Lee y col., 2003; Santos y col., 2003; Maldonado Galdeano y col., 2007; Flint y Garner, 2009). Por este motivo se caracterizó la adhesión de los microorganismos presentes en el suero fermentado con gránulos de kefir y con cepas aisladas de los mismos a células Caco-2/TC7.

**Tabla 3.2:** Adhesión de bacterias lácticas y levaduras presentes en suero fermentado con gránulos de kefir a monocapas de células Caco-2/TC7.

	Inóculo (UFC/fosa)	Adhesión (UFC/fosa)	Adhesión (%)*
Levaduras	$1.2 \pm 0.6 \times 10^6$	$1.3 \pm 0.8 \times 10^5$	10.9
BAL	$2.5 \pm 1.0 \times 10^6$	$1.9 \pm 0.5 \times 10^4$	0.8

\*Adhesión (%): (células adheridas/células agregadas a la fosa) x 100

Los valores corresponden al promedio de tres ensayos independientes

BAL= bacterias ácido lácticas

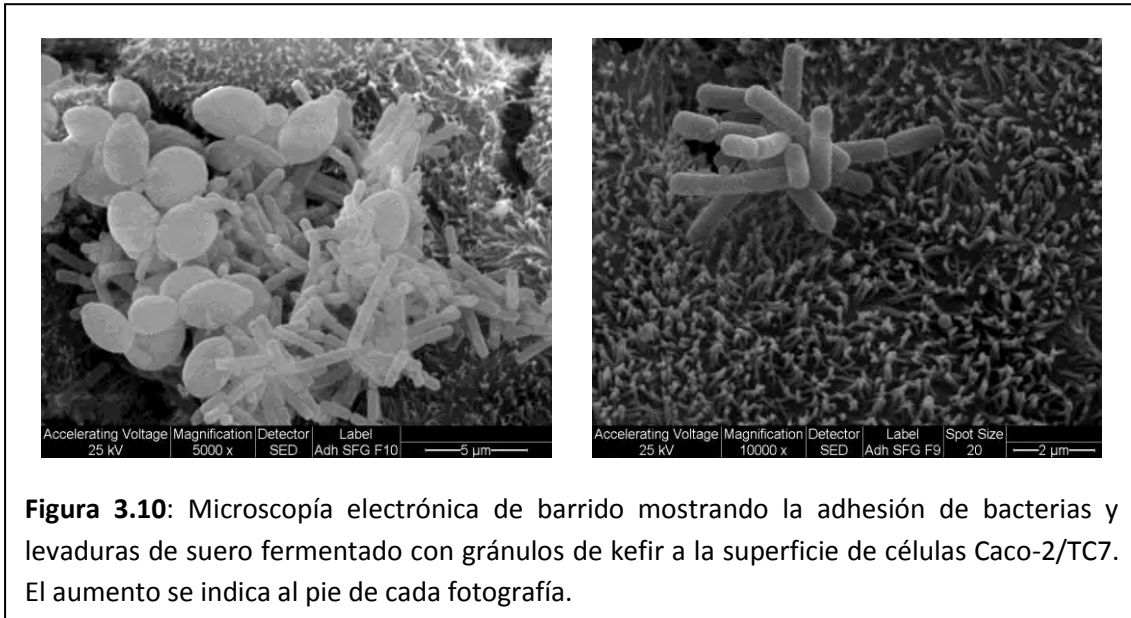
Las levaduras contenidas en el suero fermentado con gránulos de kefir presentaron mayor capacidad de adhesión (10.9 %) que las bacterias ácido lácticas (0.8 %) de este producto (Tabla 3.2).

En comparación con estudios previos de adhesión de levaduras de la industria alimentaria a cultivos de células epiteliales, el valor de adhesión hallado para las levaduras del suero fermentado (10.9 %) es alto. Van der Aa Kühle y col. (2005) describieron que, de 18 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y 8 de *S. cerevisiae* var. *boulardii* empleadas en la producción de alimentos y bebidas, sólo 4 presentaron valores de adhesión a células epiteliales de porcino IPEC-J2 superiores a 8 %, siendo para el resto de las cepas inferiores al 6 %. Klingberg y col. (2008) informaron valores de adhesión a células Caco-2 entre 0.6 % y 6.2 % para 6 cepas de *S. cerevisiae*. La alta capacidad de adhesión de levaduras de kefir había sido notada previamente por Kumura y col. (2004). Estos autores analizaron la adhesión de 4 cepas de levaduras aisladas de kefir a células Caco-2 hallando valores de 40 % para *S. cerevisiae*, 28 % para *Kluyveromyces lodderae*, 4 % para *Kluyveromyces marxianus* y 2 % para *Candida humilis*.

El porcentaje de adhesión descrito en el presente trabajo para las BAL presentes en el suero fermentado con gránulos de kefir (0.8 %) es moderado a bajo en relación a valores descritos por otros autores. Tuomola y Salminen (1998) hallaron valores de adhesión a células Caco-2 entre 3 % y 14 % para 12 cepas de *Lactobacillus* sp. empleadas en la industria láctea o en alimentos. Golowczyc y col. (2007, 2008) describieron valores de adhesión a células Caco-2/TC7 entre 0.2 % y 7 % para 19 lactobacilos heterofermentativos y entre 0.97 % y 10.5 % para 11 cepas de *Lactobacillus plantarum*, todos ellos aislados de kefir. Debe considerarse, sin embargo, que los valores reportados por estos autores corresponden a la adhesión de cepas aisladas crecidas en medio de cultivo, mientras que en el presente estudio se evalúa la adhesión de todos los microorganismos contenidos en el suero fermentado. Tanto el medio de cultivo como la interacción entre los microorganismos pueden afectar su capacidad de adhesión (Xie y col., 2012; Kankaanpää y col., 2001).

Para observar en detalle los lactobacilos y levaduras adheridos a la superficie de células Caco-2/TC7, se empleó microscopía electrónica de barrido. En distintos campos se

detectaron microorganismos aislados o agrupamientos entre bacilos o entre estos y levaduras, así como también zonas descubiertas (Figura 3.10). Cabe destacar que no se detectaron alteraciones en las células epiteliales en las zonas de contacto con los microorganismos.



**Figura 3.10:** Microscopía electrónica de barrido mostrando la adhesión de bacterias y levaduras de suero fermentado con gránulos de kefir a la superficie de células Caco-2/TC7. El aumento se indica al pie de cada fotografía.

Se estudió también la adhesión de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327, *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 y *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 aisladas de kefir crecidas durante 72 h en cultivo mixto en suero, determinándose que las 3 cepas presentaron distinta capacidad de adherirse a células Caco2/TC7 (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3:** Adhesión de cepas aisladas de kefir crecidas en suero en cultivo mixto a monocapas de células Caco-2/TC7.

	Inóculo (UFC/fosa)	Adhesión (UFC/fosa)	Adhesión (%)
<i>K. marxianus</i> CIDCA 8154	$1.9 \pm 1.7 \times 10^7$	$1.6 \pm 1.5 \times 10^6$	8.7
<i>L. plantarum</i> CIDCA 8327	$4.6 \pm 3.1 \times 10^7$	$2.8 \pm 5.3 \times 10^5$	0.6
<i>L. kefir</i> CIDCA 8348	$3.0 \pm 1.1 \times 10^7$	$3.9 \pm 1.6 \times 10^5$	1.3

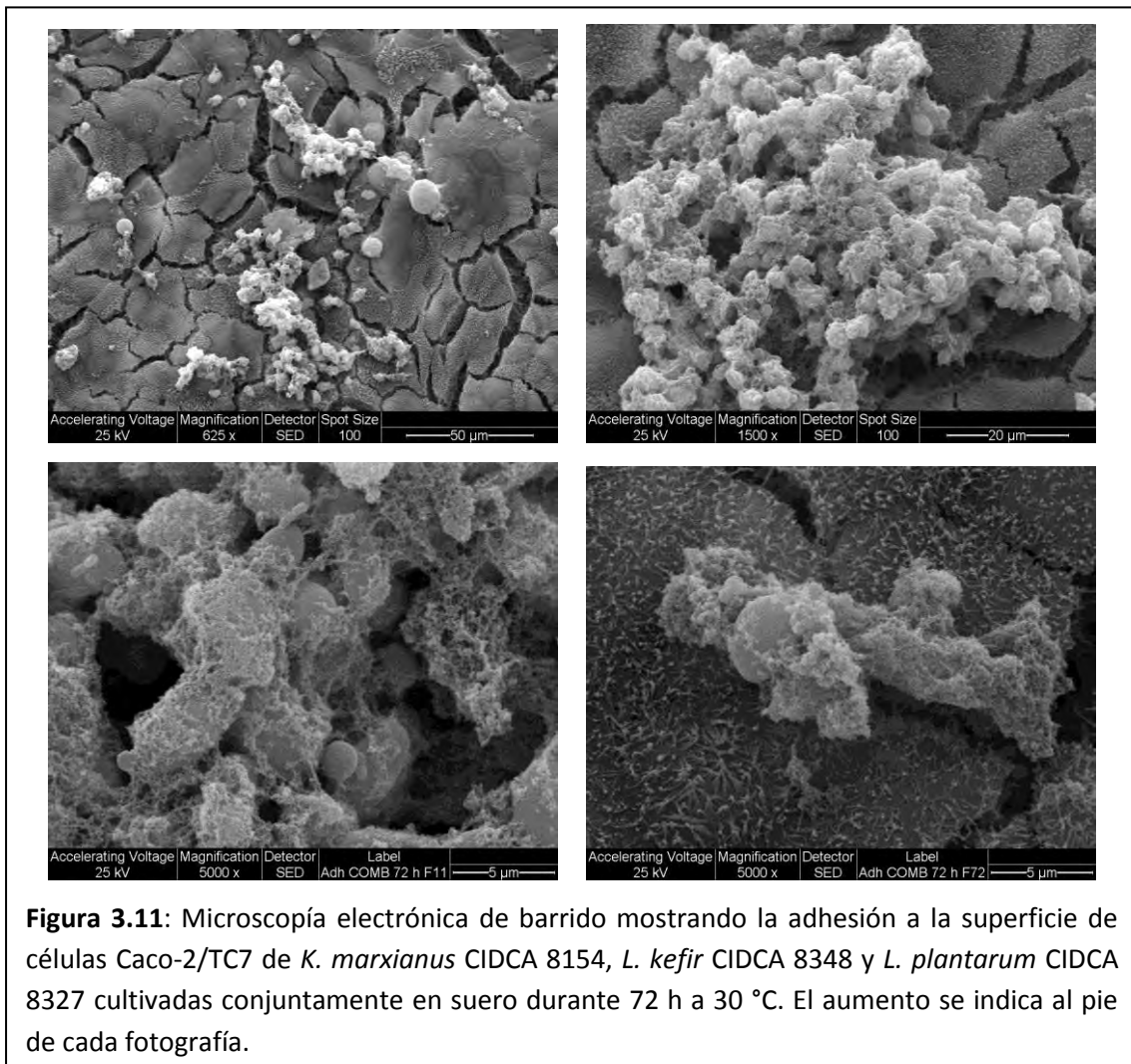
\*Adhesión (%): (células adheridas/células agregadas a la fosa) x 100.

Los valores corresponden al promedio de cuatro ensayos independientes.

La capacidad de adhesión de la levadura fue mayor que la de los lactobacilos, en concordancia con los resultados obtenidos para suero fermentado con gránulos de kefir.

Maccaferri y col. (2012) también describieron que *K. marxianus* B0399 presenta alta capacidad de adhesión a células Caco-2 en relación a cepas de lactobacilos.

Se ha descrito que *L. plantarum* CIDCA 8327 crecida en MRS presenta un porcentaje de adhesión a células Caco2/TC7 de 1.75 (Golowczyc y col., 2008) y *L. kefir* CIDCA 8348 de 4.5 (Golowczyc y col., 2007). Estos valores son superiores a los hallados en el presente estudio para las mismas cepas crecidas en cultivo mixto en suero, indicando que el medio de cultivo y la interacción entre los microorganismos afectan la capacidad de adhesión.



La adhesión de *K. marxianus* CIDCA 8154, *L. kefir* CIDCA 8348 y *L. plantarum* CIDCA 8327 cultivadas conjuntamente en suero, a la superficie de monocapas de células Caco-2/TC7 se analizó también mediante microscopía de barrido (Figura 3.11). A diferencia de lo

observado para los microorganismos del suero fermentado con gránulos de kefir (Figura 3.10), los lactobacilos y levaduras aislados de kefir se agregaron sobre la monocapa recubiertos por un material extracelular que podría corresponder a polisacáridos o proteínas secretadas por los mismos microorganismos o bien algún componente del suero que precipite junto a ellos durante la centrifugación. Dado que el suero fue tinalizado previamente a su fermentación en los ensayos con cepas aisladas de kefir (Capítulo 1, Materiales y métodos, sección 3.2) es posible que correspondan a proteínas de suero, ya el tratamiento térmico y el bajo pH en conjunto desestabilizan las proteínas de suero ocasionando su precipitación (Paulsson y col., 1985).

La formación de agregados entre microorganismos (co-agregación) es una característica considerada deseable ya que numerosos autores han señalado que contribuye a la formación de una barrera que previene la colonización de bacterias patógenas (Schachtsiek y col., 2004; Schellenberg y col., 2006; Collado y col., 2007).

Resultó evidente en la observación microscópica la co-agregación entre *K. marxianus* y lactobacilos, aunque no puede discriminarse si corresponden a *L. plantarum* y/o a *L. kefir*. Los agregados densos de microorganismos formados sobre la monocapa podrían actuar como barrera para la interacción entre patógenos y enterocitos, sin embargo también se observaron zonas de epitelio descubierto que podrían ser colonizadas por el patógeno.

### **3. Efecto de la presencia de microorganismos de kefir sobre la asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis a células Caco-2/TC7**

#### **3.1 Preincubación de la monocapa de enterocitos con microorganismos de kefir**

Uno de los mecanismos a través del cual los probióticos pueden proteger al hospedador de patógenos intestinales es mediante el denominado “efecto barrera”. Este hace referencia al proceso mediante el cual los microorganismos asociados a la monocapa impiden el contacto del patógeno con las células epiteliales evitando así su asociación e invasión.

A fin de evaluar si microorganismos contenidos en el suero fermentado con gránulos de kefir son capaces de ejercer este efecto, los mismos fueron resuspendidos en PBS,



adicionados a células Caco-2/TC7 e incubados durante 1 h a 37 °C. Durante este tiempo quedaron adheridas a la monocapa levaduras en el orden de  $10^5$  UFC/fosa y bacterias ácido lácticas en el orden de  $10^4$  UFC/fosa (ver Tabla 3.2). Luego se adicionó sobre la monocapa *Salmonella* Enteritidis 2713, CIDCA 101 o 261D en concentración  $10^8$  UFC/fosa y se evaluó la asociación del patógeno.

Pudo observarse que la preincubación de la monocapa con microorganismos de suero fermentado con gránulos de kefir no disminuyó la capacidad de asociación de ninguno de los 3 aislados de *S. Enteritidis* evaluados (Tabla 3.4).

**Tabla 3.4:** Asociación de *Salmonella* Enteritidis 2313, CIDCA 101 y 261D a monocapas de células Caco-2/TC7 preincubadas con microorganismos de kefir.

Tratamiento	2713 (UFC/fosa)	CIDCA 101 (UFC/fosa)	261D (UFC/fosa)
Control	$1.0 \pm 0.9 \times 10^{6a}$	$4.4 \pm 0.4 \times 10^{6a}$	$3.9 \pm 2.3 \times 10^{5a}$
SFG <sup>1</sup>	$2.0 \pm 1.9 \times 10^{6a}$	$5.0 \pm 2.4 \times 10^{6a}$	$3.0 \pm 2.9 \times 10^{6b}$
SFG 5x <sup>2</sup>	$5.4 \pm 1.4 \times 10^{6b}$	ND <sup>4</sup>	ND
Cepas <sup>3</sup>	$6.6 \pm 1.5 \times 10^{6b}$	ND	ND

<sup>1</sup>SFG: microorganismos presentes en suero fermentado 24 h a 20 °C con 10 % p/v de gránulos de kefir. <sup>2</sup> 5x: concentración de microorganismos cinco veces mayor. <sup>3</sup> *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327, *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 y *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 crecidos en cultivo mixto en suero durante 72 h a 30 °C. En todos los tratamientos los microorganismos fueron separados del suero fermentado por centrifugación y resuspendidos en PBS. Luego se incubaron 1 h sobre la monocapa antes de la infección con  $10^8$  UFC/fosa de *Salmonella* Enteritidis.

<sup>4</sup> ND: no determinado

Dentro de la misma columna letras distintas representan diferencias significativas evaluadas mediante el test T de *Student* a un nivel de significancia de 0.05.

Los resultados hallados podrían deberse a que, tal como se describió en la sección 2, las bacterias y levaduras se hallan dispersas o formando grupos sobre la monocapa, quedando zonas descubiertas que pueden ser colonizadas por el patógeno (Figura 3.10). Otros autores han reportado que, cuando los microorganismos adheridos a células epiteliales *in-vitro* no forman una cubierta homogénea, no impiden la asociación del patógeno (Golowcycz y col., 2009; Martins y col., 2010).

A fin de aumentar la cantidad de microorganismos de kefir adheridos y reducir así los espacios libres para la colonización del patógeno se aumentó 5 veces la concentración de microorganismos adicionada a la monocapa. En contraposición con el resultado esperado se halló que la asociación de *Salmonella* Enteritidis fue significativamente mayor que en el control (Tabla 3.4). Un resultado similar se obtuvo al pre-incubar la monocapa con cepas aisladas de kefir crecidas en suero. En este caso el número de microorganismos de kefir que adhieren a la monocapa es ~ 10 veces superior que al pre-incubar la monocapa con los microorganismos de suero fermentado con gránulos de kefir, ya que quedan adheridas levaduras en el orden de  $10^6$  UFC/fosa y bacterias ácido lácticas en el orden de  $10^5$  UFC/fosa (ver Tabla 3.3). Sin embargo, la cantidad de *Salmonella* asociada aumenta significativamente (Tabla 3.4). Este resultado podría deberse a la capacidad de *Salmonella* de formar agregados con algunos de los microorganismos de kefir previamente adheridos a la monocapa.

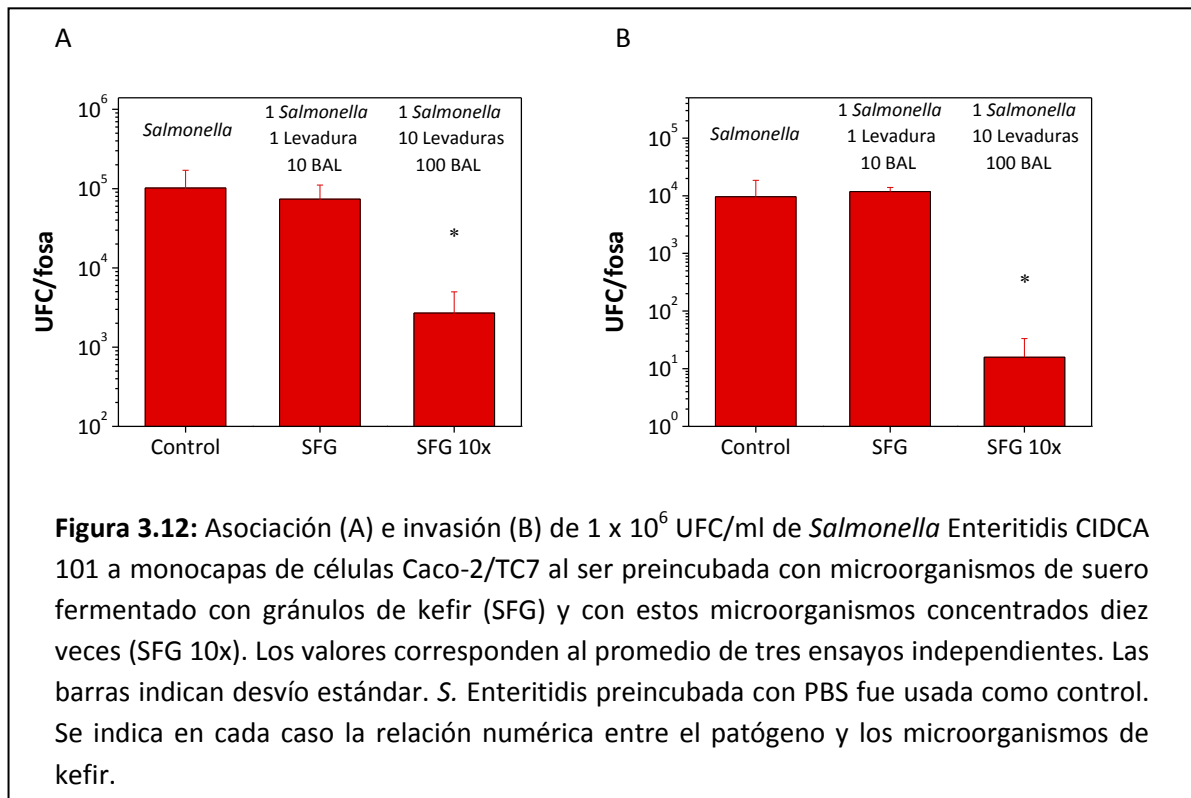
En concordancia con los resultados hallados en este estudio, Golowczyc y col. (2007) no hallaron efecto protector de la asociación ni la invasión de *S. Enteritidis* por lactobacilos aislados de kefir cuando estos eran incubados sobre la monocapa previamente a la infección.

### **3.2 Preincubación de *Salmonella* Enteritidis con microorganismos de kefir**

Los probióticos también pueden interaccionar superficialmente con los patógenos antes de su unión al epitelio intestinal afectando su asociación por interferencia con receptores o estructuras de adhesión implicadas en el proceso. Se estudió por consiguiente si la incubación previa de *Salmonella* Enteritidis con microorganismos de kefir afectaba la capacidad del patógeno de asociarse y/o invadir la monocapa de células Caco-2/TC7. Para esto, se preincubó *Salmonella* durante 1 h a 37 °C con los microorganismos del suero fermentado y luego la mezcla se colocó sobre la monocapa, evaluándose distintas relaciones de concentración entre el patógeno y los probióticos.

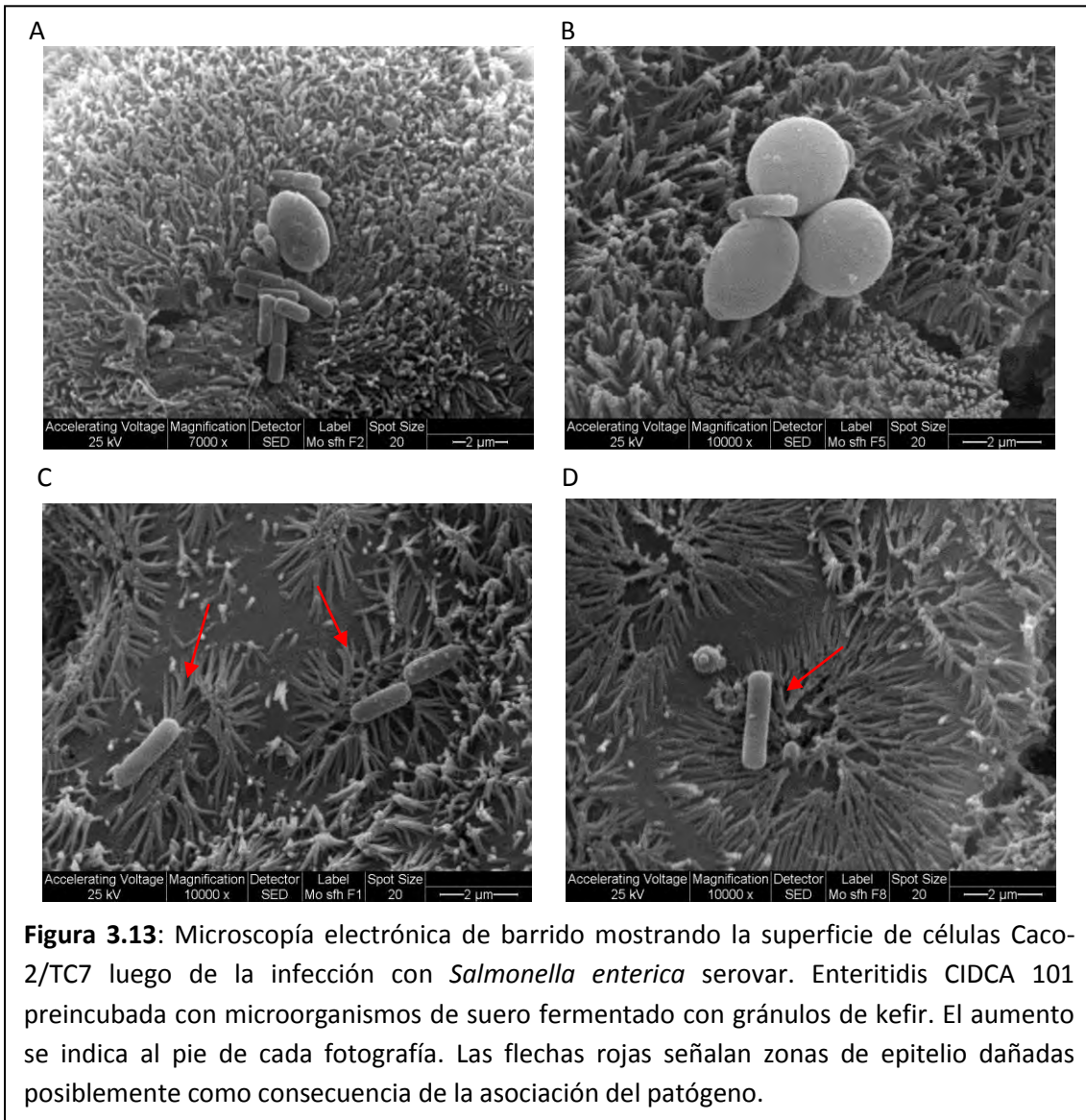
Cuando se preincubó *S. Enteritidis* CIDCA 101 en concentración  $10^6$  UFC/ml con los **microorganismos de suero fermentado con gránulos de kefir** ( $10^7$  UFC/ml de BAL y  $10^6$  UFC/ml de levaduras) la relación fue de 1 levadura y 10 BAL por cada *Salmonella*. En estas proporciones no se hallaron diferencias significativas en la asociación ni la invasión del patógeno a la monocapa (Figura 3.12).

Al realizar el mismo ensayo empleando la misma multiplicidad de infección del patógeno y concentrándose 10 veces los microorganismos de kefir ( $10^8$  UFC/ml de BAL y  $10^7$  UFC/ml de levaduras) la asociación del patógeno disminuyó significativamente (Figura 3.12 A). Asimismo se hallaron diferencias significativas en la invasión con esta relación probióticos/*Salmonella* (10 levaduras y 100 BAL por cada *Salmonella*) (Figura 3.12 B).

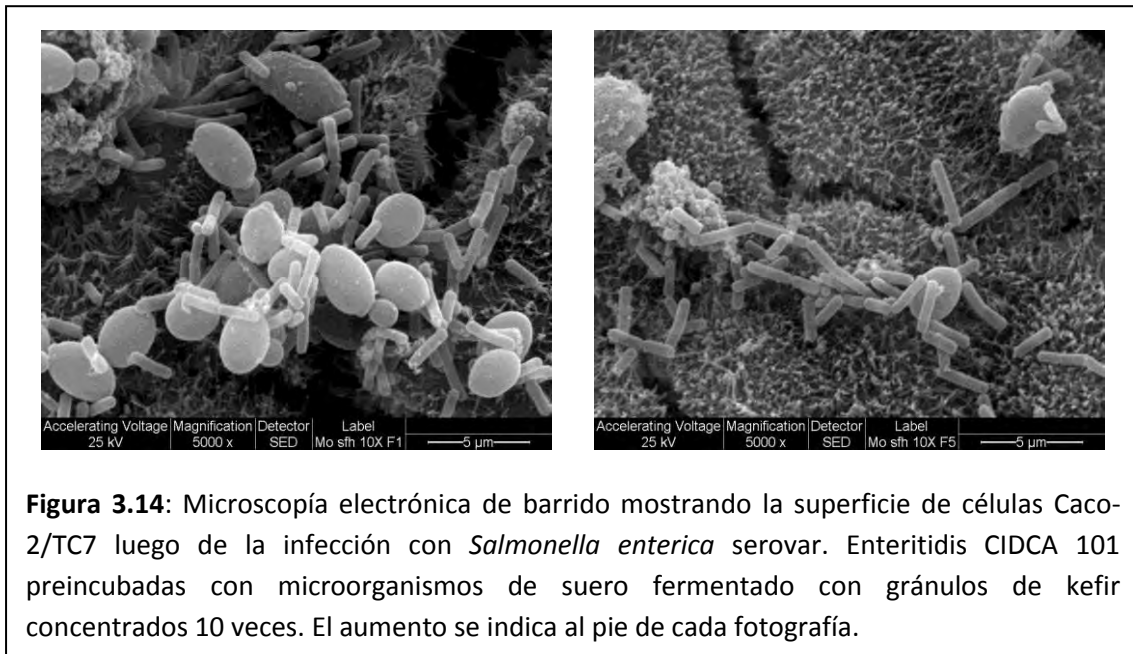


La diferencia entre la relación patógeno/probiótico fue asimismo evidente al observar la superficie de la monocapa por microscopía de barrido. Cuando la cantidad de probiótico fue sólo 10 veces superior que la del patógeno, se observaron sobre la monocapa grupos dispersos de bacterias y levaduras (Figura 3.13 A y B). Asimismo se hallaron zonas de epitelio dañadas posiblemente colonizadas por el patógeno (Figura 3.13 C y D).

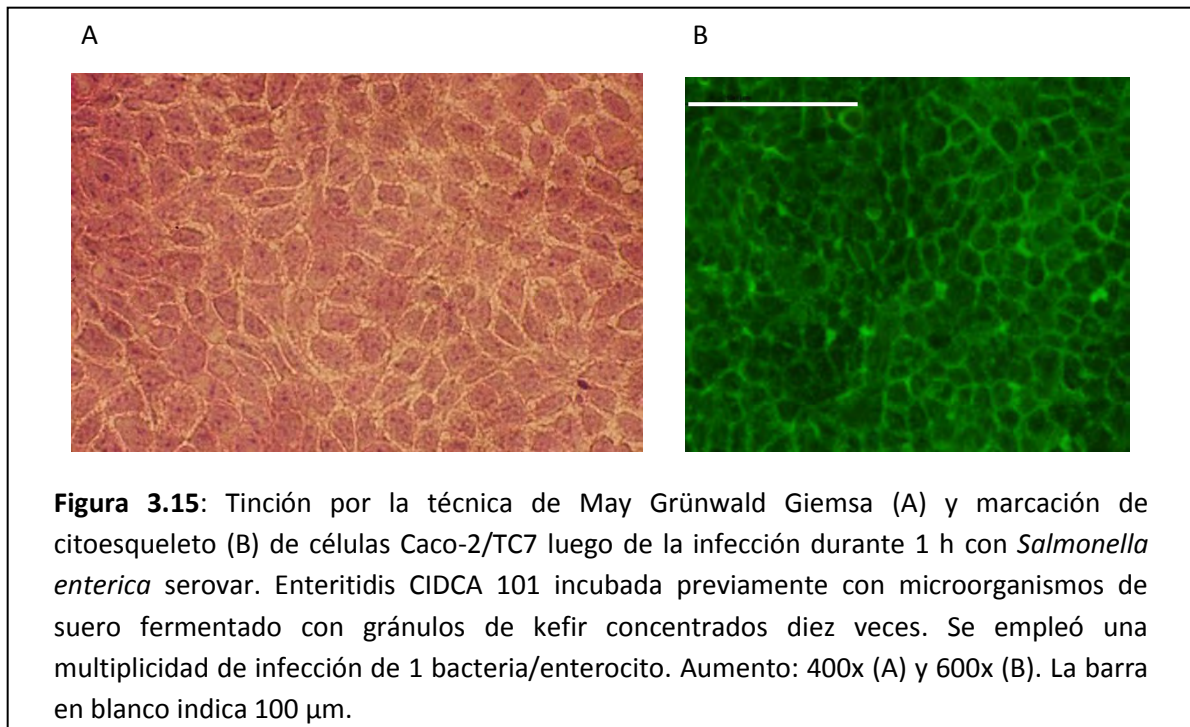




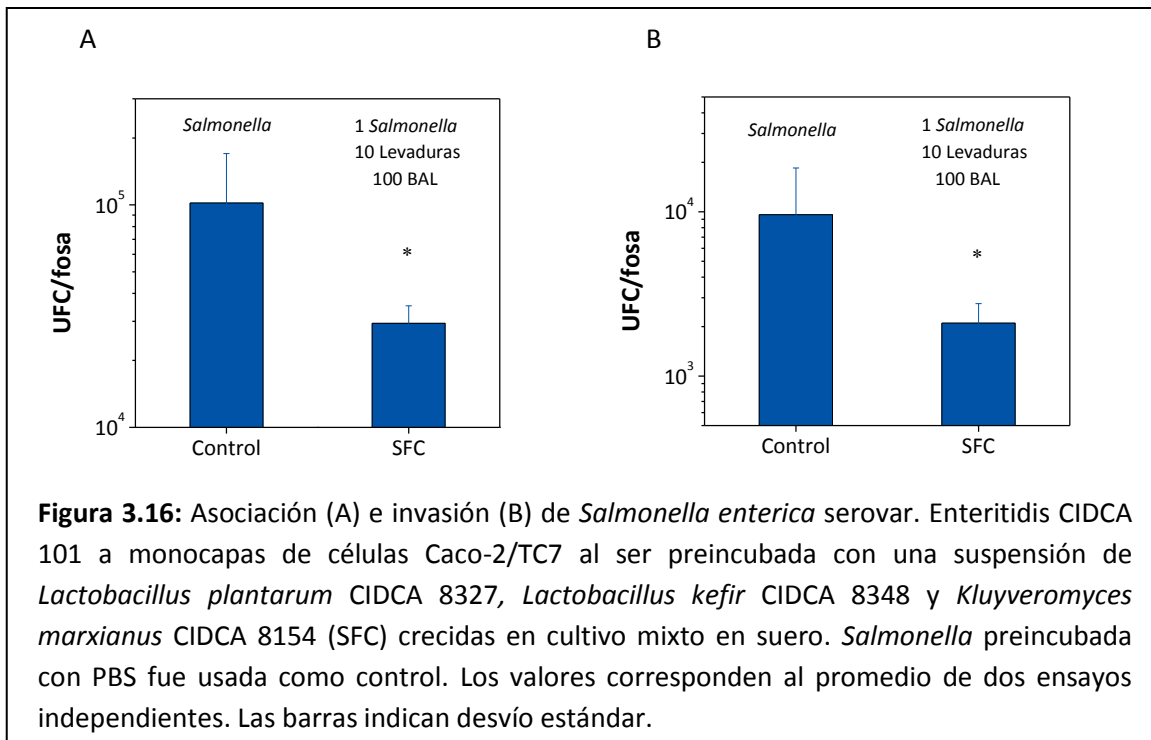
Cuando se aumentó 10 veces la concentración de microorganismos de suero fermentado se observó la formación de una cubierta compuesta por lactobacilos y levaduras sobre la monocapa (Figura 3.14) y no se observaron zonas de epitelio dañado por el patógeno.



La observación microscópica de la morfología y del citoesqueleto de los enterocitos indicó asimismo una protección contra los daños causados por el patógeno (Figuras 3.7 B y 3.8 C y D) debido a los microorganismos del suero fermentado con gránulos de kefir concentrados 10 veces, ya que la monocapa no presentó alteraciones luego de la infección con el patógeno (Figura 3.15).



Se estudió asimismo, el efecto de la preincubación de *S. Enteritidis* CIDCA 101 con **cepas aisladas de kefir** crecidas en suero. Cuando se fermentó suero durante 72 h con un cultivo mixto de *L. kefir*, *L. plantarum* y *K. marxianus* la concentración de ambos lactobacilos en el producto fue  $1 \times 10^8$  UFC/ml y la de la levadura  $1 \times 10^7$  UFC/ml (Capítulo 1, Figura 1.28). Los microorganismos de este producto fueron centrifugados y resuspendidos en igual volumen de PBS. Luego esta suspensión se incubó 1 h a  $37^\circ\text{C}$  con *Salmonella* en concentración  $10^6$  UFC/ml en PBS. La relación de concentración entre el probiótico y el patógeno fue por lo tanto de 100 bacterias ácido lácticas y 10 levaduras por cada *Salmonella*. Cuando se infectó la monocapa con *Salmonella* preincubada con las cepas aisladas de kefir tanto la asociación como la invasión disminuyeron significativamente respecto al control ( $p > 0.05$ ) (Figura 3.16).

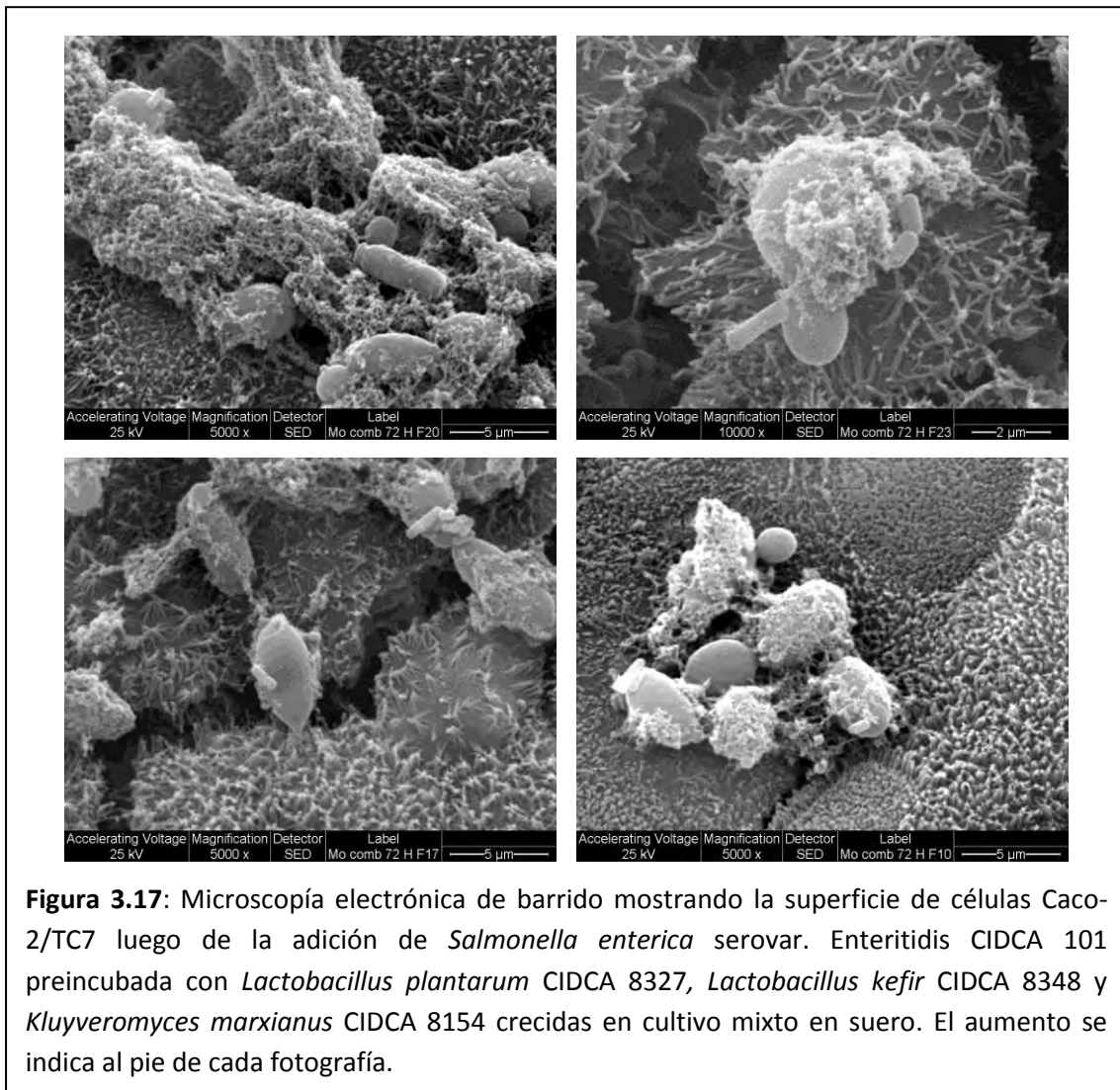


Golowczyk y col., 2007 describieron que *L. kefir* CIDCA 8348 tiene la capacidad de co-agregar con *Salmonella* Enteritidis y que esta habilidad está directamente relacionada con la menor capacidad de invasión a células Caco-2 observada en *Salmonella* luego de ser preincubada con el lactobacilo. Es por lo tanto probable que la co-agregación de *L. kefir* con *Salmonella* esté implicada en el efecto protector de la invasión hallado en el presente estudio. Por otro lado se ha descrito que *L. plantarum* CIDCA 8327 no co-agrega con

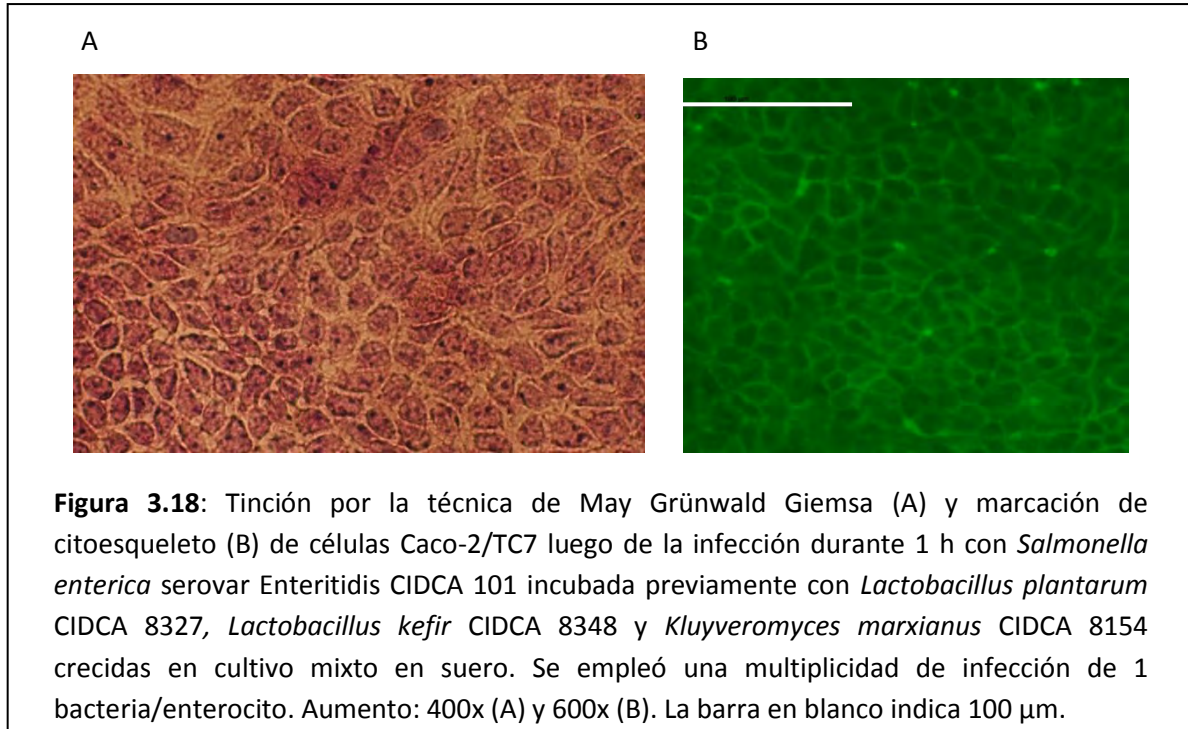


*Salmonella* Enteritidis (Golowczyc, 2008), pero su capacidad y la de *K. marxianus* CIDCA 8154 de antagonizar la asociación de *Salmonella* a células epiteliales no ha sido previamente estudiada.

Cuando se analizaron al microscopio de barrido los enterocitos luego de su tratamiento con *Salmonella* Enteritidis preincubada con *L. plantarum* CIDCA 8327, *L. kefir* CIDCA 8348 y *K. marxianus* CIDCA 8154, se observó sobre la monocapa la misma red de microorganismos cubiertos por material extracelular (Figura 3.17) que cuando se analizó la adhesión de las cepas de kefir en ausencia del patógeno (Figura 3.11). Como se describió anteriormente este material posiblemente corresponda a proteínas del suero y cuya implicancia en el efecto protector observado sería interesante indagar.



Mediante observaciones microscópicas no pudieron detectarse alteraciones de la morfología de los enterocitos ni de la organización del citoesqueleto luego de la infección de la monocapa con el patógeno preincubado con *L. plantarum* CIDCA 8327, *L. kefir* CIDCA 8348 y *K. marxianus* CIDCA 8154 crecidas en cultivo mixto en suero (Figura 3.18). Esto refuerza las pruebas de que este tratamiento protege los enterocitos contra el daño ocasionado por el patógeno sobre el epitelio intestinal.

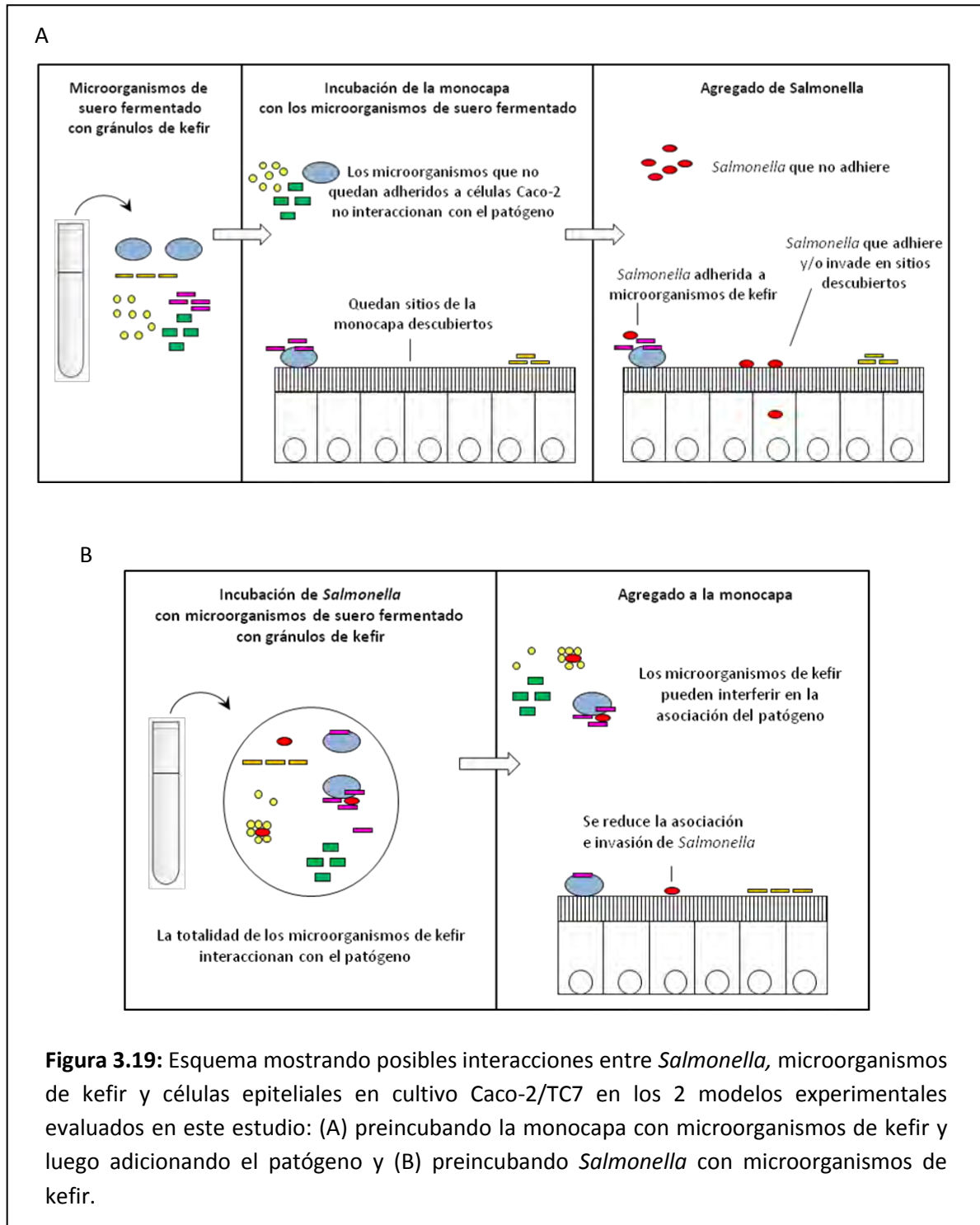


Se demuestra de este modo, un efecto protector de la asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis por levaduras y bacterias ácido lácticas presentes en suero fermentado con gránulos de kefir cuando su concentración es 10 y 100 veces superior respectivamente a la del patógeno. A esta misma relación de concentración se observa el efecto protector de cepas aisladas de kefir crecidas en cultivo mixto en suero. Sin embargo debe notarse que la reducción de la asociación e invasión de *S. Enteritidis* fue mayor ( $\sim 2$  órdenes logarítmicos) cuando se preincubó el patógeno con los microorganismos presentes en el suero fermentado con gránulos de kefir que con cepas aisladas de kefir ( $\sim 1$  orden logarítmico). Aún cuando se seleccionaron cepas aisladas de kefir con potencialidad para antagonizar la acción de patógenos intestinales, no se logra reproducir el efecto protector del producto

obtenido a partir de la fermentación con gránulos de kefir. El suero fermentado con gránulos contiene especies que no se encuentran en el cultivo mixto, tales como *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus parakefir*, *Lactococcus lactis*, y *Saccharomyces cerevisiae* (Capítulo 1, Resultados y discusión, sección 1.2). Asimismo debe considerarse que el kefir contiene diversidad de cepas de cada especie que difieren en su capacidad antagónica contra patógenos (Golowczyk y col., 2007; Garrote y col., 2010). La multiplicidad de interacciones entre microorganismos que permite esta diversidad constituye la base del poder del kefir como probiótico, que no logró reproducirse mediante formulaciones simplificadas.

Los resultados hallados en el presente trabajo indican que la acción protectora de los microorganismos del suero fermentado sobre la asociación de *Salmonella* Enteritidis a enterocitos en cultivo es dependiente de la relación numérica entre el patógeno y los probióticos. Bernet y col. (1994) llegaron al mismo resultado utilizando *Salmonella* Typhimurium y *L. acidophilus*. Mientras que a una relación 1:10 de probiótico:patógeno el porcentaje de inhibición de la invasión es 9 %, el mismo asciende a 37 % cuando la relación es 1:1. Coconnier y col. (1993) también reportaron que el efecto protector de la invasión de *S. Typhimurium* por *L. acidophilus* es dosis dependiente.

Por otro lado se halló protección contra la asociación de *Salmonella* Enteritidis a la monocapa cuando los microorganismos de kefir fueron incubados con el patógeno previamente a la infección, mientras que no hubo efecto protector cuando los mismos se encontraron adheridos a la monocapa. Esto puede deberse a que cuando se adicionan microorganismos de kefir a la monocapa antes de la infección, solo un pequeño porcentaje (~ 0.5 a 10 %) de BAL y levaduras de kefir se adhieren a las células epiteliales, quedando sitios descubiertos que podrían ser colonizados por el patógeno. Cuando se incuba el patógeno previamente a la infección con los microorganismos de kefir, la totalidad de microorganismos presentes y no sólo los que adhieren pueden interactuar con el patógeno (Figura 3.19).

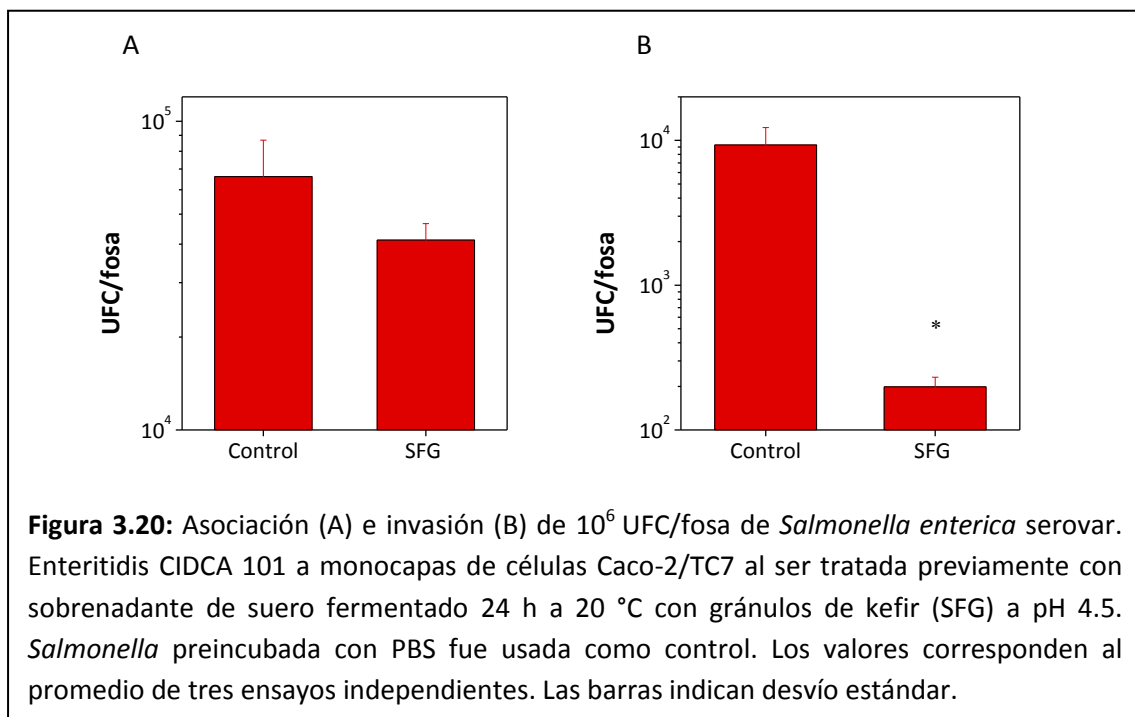


#### 4. Efecto de los sobrenadantes de suero fermentado sobre la asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis a células Caco-2/TC7

Además de analizar el efecto de los microorganismos de kefir se estudió si los metabolitos producidos por los mismos durante la fermentación de suero poseen algún efecto sobre la asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis. Para esto el patógeno fue preincubado durante 1 h a 37 °C con sobrenadantes de suero fermentado con gránulos de kefir o con cepas aisladas de kefir.

Para evaluar la asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis tratada con sobrenadante de suero fermentado con gránulos de kefir y debido al efecto bactericida de este producto descrito en el Capítulo 2, el sobrenadante que presenta pH 3.6 debió ser llevado a pH 4.5. De esta manera, no se afectó la viabilidad de *S.* Enteritidis durante el tiempo de incubación (1 h a 37 °C).

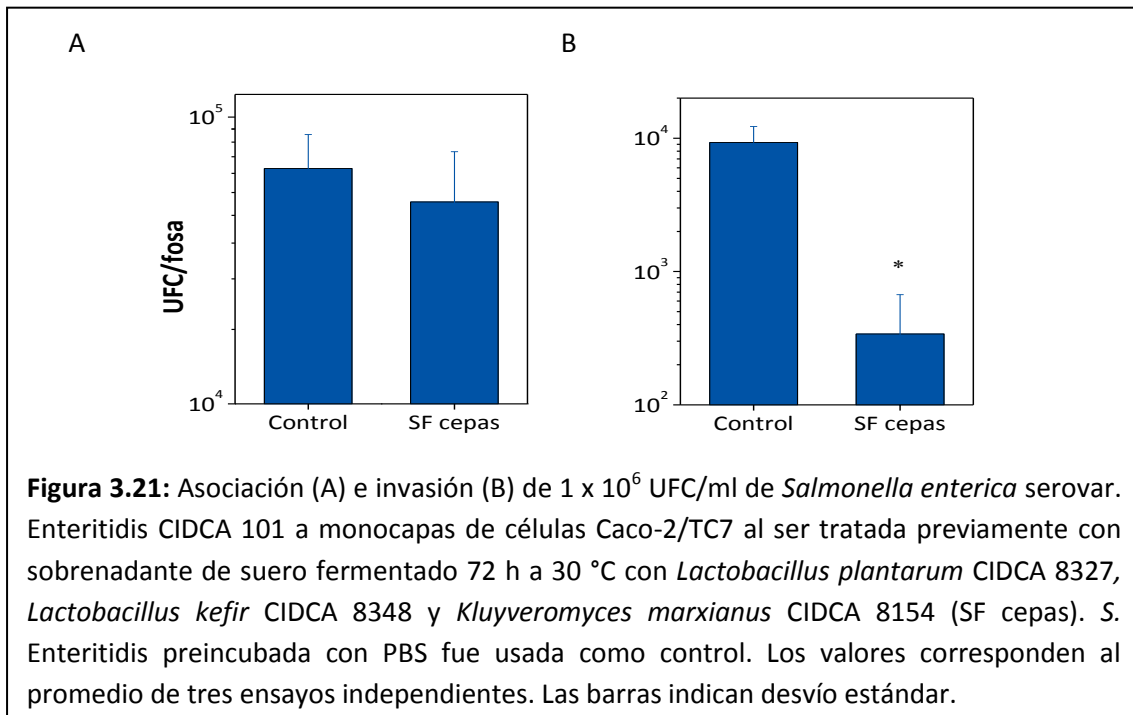
Cuando *Salmonella* Enteritidis CIDCA 101 fue tratada con sobrenadante de suero fermentado con gránulos de kefir a pH 4.5 no se obtuvieron diferencias significativas en la asociación del patógeno a células epiteliales (Figura 3.20 A) pero si disminuyó significativamente su invasión (Figura 3.20 B).



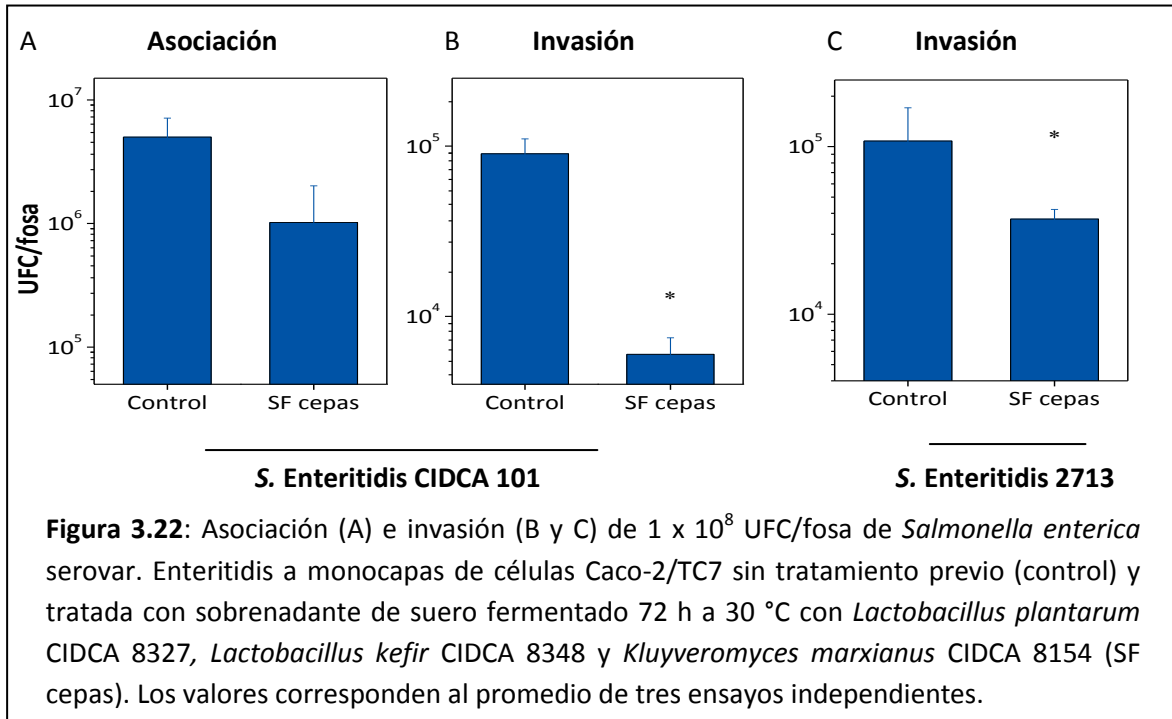
**Figura 3.20:** Asociación (A) e invasión (B) de  $10^6$  UFC/fosa de *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis CIDCA 101 a monocapas de células Caco-2/TC7 al ser tratada previamente con sobrenadante de suero fermentado 24 h a 20 °C con gránulos de kefir (SFG) a pH 4.5. *Salmonella* preincubada con PBS fue usada como control. Los valores corresponden al promedio de tres ensayos independientes. Las barras indican desvío estándar.



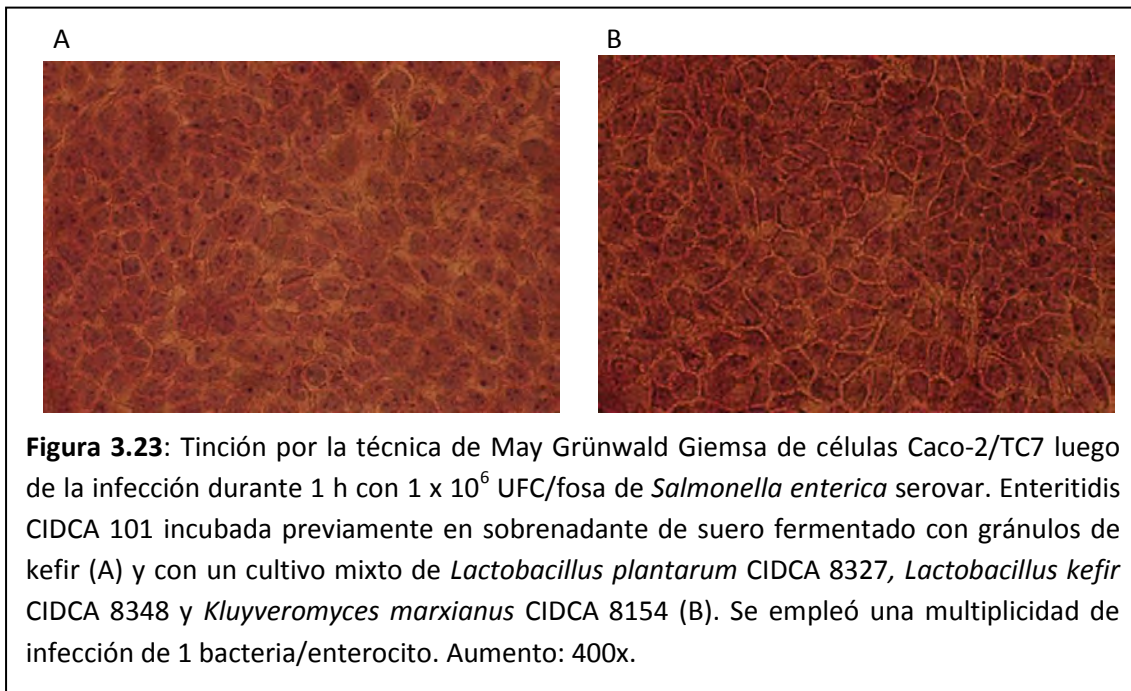
Se evaluó también el efecto del **sobrenadante de suero fermentado con cepas aisladas de kefir**. Durante la incubación del patógeno con este sobrenadante que presenta pH 4.5 no se observó disminución de la viabilidad de *Salmonella*, no se obtuvieron diferencias significativas en la asociación (Figura 3.21 A) mientras que la capacidad invasiva del patógeno se redujo significativamente (Figura 3.21 B).



Cuando se evaluó una mayor dosis infectiva de *S. Enteritidis* CIDCA 101 ( $10^8$  UFC/fosa) se obtuvieron los mismos resultados, hallándose protección de la invasión por el tratamiento con sobrenadante de suero fermentado con cepas y no de la asociación (Figura 3.22 A y B). Para *S. Enteritidis* 2713 también se observó una reducción de la invasión por el tratamiento aunque el efecto protector fue menor que para la cepa CIDCA 101 (Figura 3.22 B vs. C). Lin y col. (2008) también hallaron distinta protección de la invasión para 2 cepas de *Salmonella choleraesuis* por *Lactobacillus acidophilus*. Estos autores atribuyeron las diferencias a la distinta capacidad adhesiva e invasiva de ambas cepas patógenas ya que la cepa con mayor capacidad de adhesión e invasión resultó menos protegida.



En correspondencia con los resultados antes presentados, el aspecto morfológico (Figura 3.23) de las células Caco-2/TC7 luego de la infección con *S. Enteritidis* CIDCA 101 tratada con sobrenadante de suero fermentado con gránulos de kefir y con cepas aisladas de kefir no se vio alterada.



En conjunto los resultados indican que los sobrenadantes ejercen un efecto protector sobre la invasión del patógeno a la monocapa, mientras que no se observa efecto en la asociación del mismo a las células epiteliales. De manera similar a lo hallado en el presente estudio, Hudault y col. (1997) demostraron que al tratar *Salmonella* Typhimurium durante 1 h con el sobrenadante de un cultivo de *L. casei* GG, la invasión del patógeno a células Caco-2 se reduce significativamente mientras que la asociación no se modifica.

Es sabido que los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) pueden interferir en la expresión de genes asociados a la invasión de *Salmonella*, reprimiendo o induciendo el proceso de acuerdo al tipo de ácido y a la concentración en que se produzca (Altier, 2005). Lawhon y col. (2002) demostraron que una mezcla de SCFAs que replica las condiciones del íleon distal induce la expresión de genes SPI-1, implicados en la invasión, mientras que los mismos ácidos en las proporciones que se encuentran en el colon pueden reprimir los mismos genes. El efecto sobre la invasión de *Salmonella* de ácidos orgánicos que se encuentran en altas concentraciones en el tracto gastrointestinal, tales como el acético, el butírico y el propiónico, ha sido bien caracterizado (Durant y col, 1999, 2000; Lawhon, 2002; Van Immerseel, 2003, 2004, 2006). Menos se conoce sobre el efecto de otros como el ácido láctico. Hudault y col. (1997) observaron que el efecto protector de la invasión de *S. Typhimurium* a células Caco-2 por el tratamiento con sobrenadante de un cultivo de *L. casei* GG se perdía al neutralizar el sobrenadante. Sin embargo, reportaron que el pH por sí mismo no era suficiente para reducir la invasión a los niveles hallados y en consecuencia atribuyeron el efecto a algún metabolito producido por el lactobacilo que sea activo a bajo pH sugiriendo que podría deberse a la presencia de ácido láctico en concentración subletal. Makras y col. (2006) probaron que sobrenadantes de cultivo de 4 cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* sp. y medio de cultivo adicionado con la misma concentración de ácido láctico presente en los sobrenadantes ejercían idéntico efecto reductor de la invasión de *S. Typhimurium* a células Caco-2/TC7, indicando que el ácido láctico es responsable de la inhibición de la invasión de *Salmonella* a cultivos celulares. Sin embargo estos mismos autores observaron que para 2 de las cepas estudiadas (*L. johnsonii* La1 y *L. plantarum*) la reducción de la invasión no podía explicarse sólo por la presencia de este ácido, sugiriendo

que habría implicada otra sustancia inhibitoria de naturaleza desconocida. Golowczyc y col. (2007) también describieron que el efecto protector de sobrenadantes de 5 cepas de *Lactobacillus kefir* sobre la asociación e invasión de *S. Enteritidis* no podía explicarse sólo por la presencia de ácido láctico. Estos autores hallaron que la proteína de capa-S a la concentración en que se encuentra en sobrenadantes de cultivo de *L. kefir* es capaz de asociarse a la superficie de *Salmonella* e interferir con su capacidad de invasión.

Asimismo alguno de los componentes del suero podría estar implicado en la protección contra *Salmonella* observada en este estudio. Halpin y col. (2010) demostraron que el suero protege contra la asociación de *S. Typhimurium* a monocapas de células en cultivo y que al ser hidrolizado aumenta significativamente su capacidad de prevenir la invasión de este patógeno. Nascimento De Araújo y Giugliano (2000) describieron que el suero de leche humana inhibe la asociación de *E. coli* a células en cultivo y presentaron evidencias de que la lactoferrina e inmunoglobulinas presentes en el mismo intervienen en este efecto.

En el presente estudio se demuestra que la incubación de *Salmonella* en sobrenadante de suero fermentado reduce su capacidad de invasión a células Caco-2/TC7, sin embargo más estudios son necesarios a fin de determinar en qué medida este efecto se debe a la presencia de ácidos orgánicos u otros metabolitos o a componentes del suero que interfieran en los mecanismos de invasión del patógeno.



## **PARTE B: Antagonismo de suero fermentado sobre la adhesión e invasión de *Salmonella* Enteritidis en modelos *in vivo***

Una vez demostrada la capacidad del suero fermentado de antagonizar la adhesión e invasión de *Salmonella* Enteritidis *in vitro*, se procedió a evaluar el efecto de su administración a pollos parrilleros como tratamiento preventivo de la colonización intestinal y translocación de este patógeno.

Para los ensayos *in vivo* se seleccionó la cepa *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis 261D debido a que se había aislado a partir de una reproductora COBB de un criadero de Portugal víctima de un episodio grave de salmonelosis. La cepa había mostrado alta invasividad, produciendo importantes mortandades diarias y no respondía a los tratamientos, debiendo sacrificarse todo el lote de reproductoras.

En un ensayo inicial se analizó la inocuidad del suero fermentado y su efecto sobre la microbiota intestinal de las aves. Luego se realizaron 3 ensayos en los cuales se varió la cantidad y forma de administración del probiótico, así como la dosis infectiva de *Salmonella*.

### **1. Inocuidad del suero fermentado sobre pollos parrilleros**

Se determinó si el consumo de suero fermentado con gránulos de kefir y con cultivo madre en suero causa algún desorden alimentario u otro efecto negativo en pollos parrilleros. Además se analizó el efecto ejercido por los microorganismos presentes en el suero fermentado con cultivo madre en suero resuspendidos en buffer fosfato, en ausencia de los productos del metabolismo.

Los productos fueron administrados durante 10 días consecutivos registrándose diariamente el aumento de peso, el consumo de agua y el consumo de alimento por individuo como indicadores del estado de salud de los pollos. En base a estos datos se calculó la conversión alimentaria que es una medida de la productividad de un animal y se define como la relación entre el alimento que consume cada pollo y el peso que gana. También se registró diariamente la humedad de las heces siendo este un parámetro indicador de la respuesta de pollos ante modificaciones en la alimentación (Eichner y col., 2007; Namroud y col., 2008; Collett, 2012).

A fin de variar la dosis de probiótico administrada se seleccionaron 2 productos con distinto contenido de BAL y levaduras en base a resultados obtenidos durante este trabajo, presentados en el Capítulo 1. Se utilizaron: 1) suero fermentado con gránulos de kefir con un contenido de BAL de  $1 \times 10^7$  UFC/ml y de levaduras de  $4 \times 10^6$  UFC/ml y 2) suero fermentado con cultivo madre en suero cuya concentración de BAL es  $1 \times 10^8$  UFC/ml y de levaduras  $1 \times 10^7$  UFC/ml. Asimismo se analizó el efecto de los microorganismos de este último producto resuspendidos en PBS en ausencia de los productos de su metabolismo. Los productos fueron administrados en una **dosis definida** de 1 ml diario aplicada en el pico de cada individuo.

El promedio y desvío estándar de la humedad de las heces de cada grupo, medidas para cada individuo durante 10 días (60 mediciones por tratamiento) se presenta en la Tabla 3.5.

**Tabla 3.5:** Humedad de las heces promedio medidas durante 10 días de tratamiento.

Tratamiento	Humedad de las heces promedio $\pm$ DS <sup>1</sup> (%)
Control	66.4 $\pm$ 7.5 <sup>a2</sup>
Suero fermentado con gránulos de kefir	69.3 $\pm$ 10.8 <sup>a</sup>
Suero fermentado con cultivo madre en suero	66.7 $\pm$ 6.9 <sup>a</sup>
Microorganismos de suero fermentado con cultivo madre en suero	69.5 $\pm$ 7.3 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Se presenta el promedio  $\pm$  el desvío estándar (DS) de los valores diarios registrados durante 10 días para 6 individuos por tratamiento (n=60). Edad de las aves: 14 a 24 días.

<sup>2</sup> Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre tratamientos analizadas mediante ANOVA.

No se observaron diferencias significativas en la humedad de las heces de los individuos pertenecientes a distintos tratamientos. Este es un dato relevante ya que la humedad de las heces además de ser un indicador del estado de salud intestinal de las aves, reviste importancia en la industria avícola al influir en el estado sanitario de la cama. La cama se define como la combinación del material del lecho, el excremento, plumas, alimento y agua derramados. La humedad de la cama y el estado del excremento son los factores más importantes que determinan las condiciones de las mismas. Las condiciones de la cama influyen significativamente en el rendimiento y en la rentabilidad de la producción de los pollos parrilleros, una excesiva humedad puede conducir a altas emisiones de

amoniaco, dermatitis plantar, pérdidas en el procesamiento y decomisos (Weaver y Meijerhof, 1991).

Los valores de consumo total de alimento y agua durante los 10 días de ensayo tampoco resultaron significativamente diferentes ( $P>0.05$ ) entre los pollos que se sometieron a los distintos tratamientos (Tabla 3.6).

**Tabla 3.6:** Consumo total de agua y alimento por individuo en 10 días de ensayo

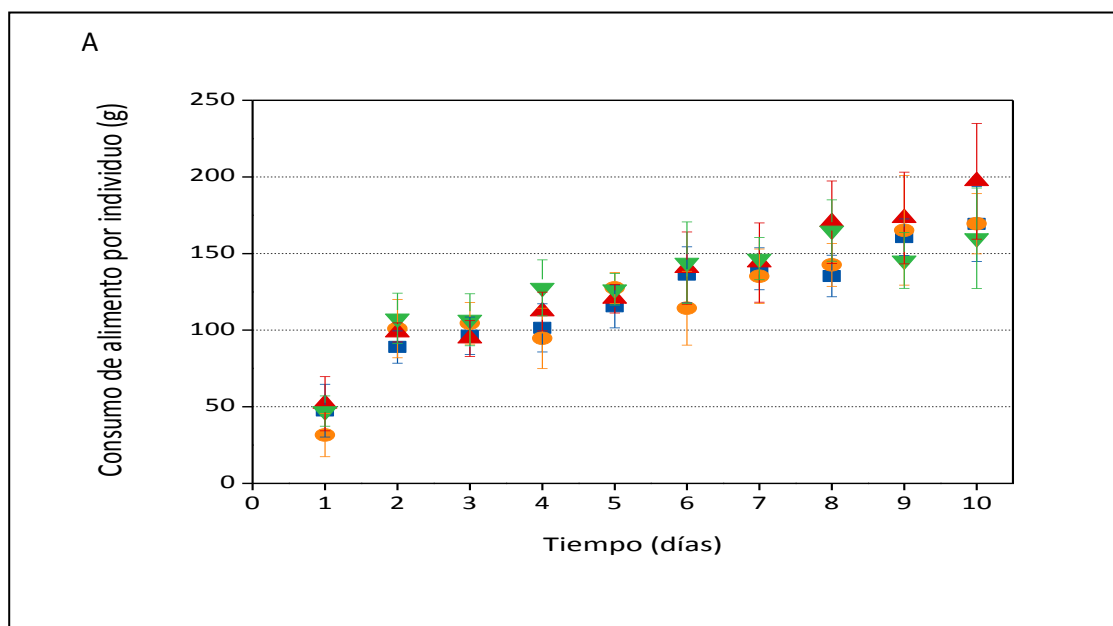
Tratamiento <sup>1</sup>	Consumo total de agua (L)	Consumo total de alimento (kg)
Control	1.80 ± 0.28 <sup>a2</sup>	1.19 ± 0.12 <sup>a2</sup>
SFG	2.22 ± 0.29 <sup>a</sup>	1.19 ± 0.22 <sup>a</sup>
SFC	1.83 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.30 ± 0.21 <sup>a</sup>
MSF	2.24 ± 0.28 <sup>a</sup>	1.27 ± 0.08 <sup>a</sup>

Se presenta el valor promedio ± desvío estándar de los 6 individuos de cada tratamiento. Edad: 14 a 24 días.

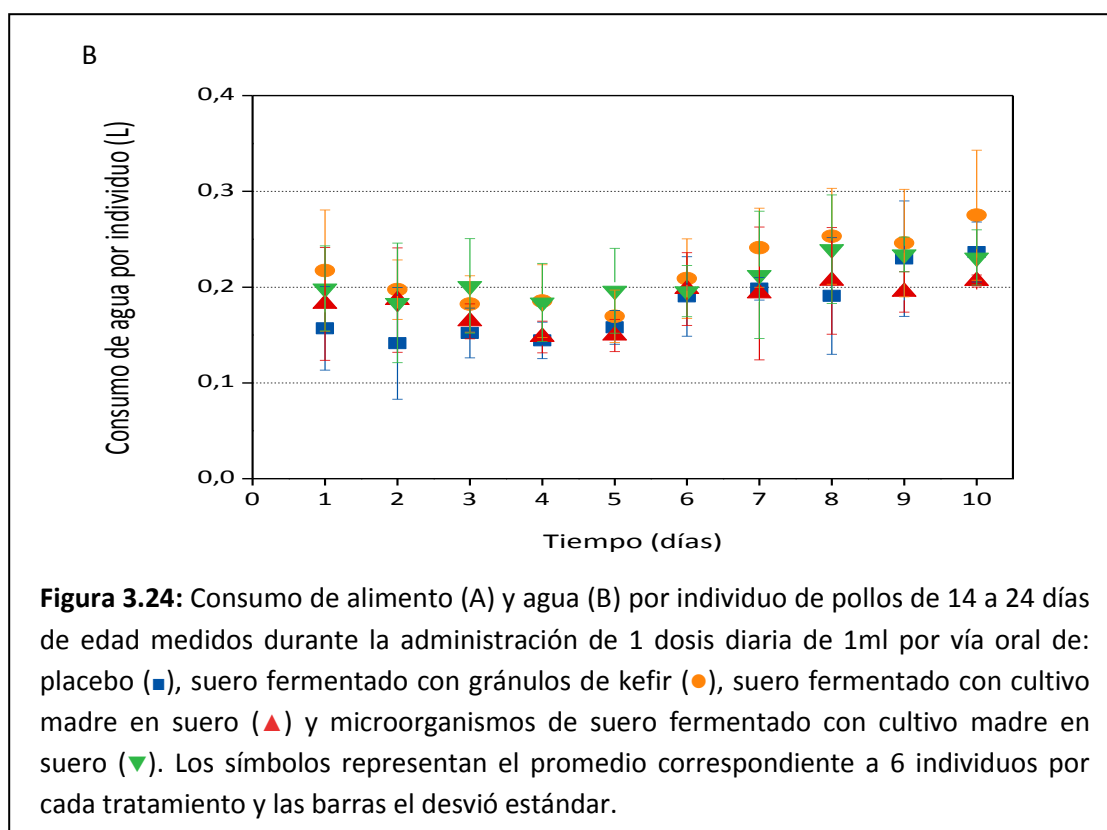
<sup>1</sup> Administración durante 10 días de 1 dosis diaria de 1ml por vía oral de: placebo (control), suero fermentado con gránulos de kefir (SFG), suero fermentado con cultivo madre en suero (SFC) y microorganismos de suero fermentado con cultivo madre en suero (MSF).

<sup>2</sup> Letras iguales en la misma columna significan que no hay diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha=0.05$ ).

El consumo de alimento aumentó constantemente en el tiempo, registrándose valores de consumo de ~ 50 g por individuo al inicio del ensayo y de 140 a 200 g al final del mismo (Figura 3.24 A). El consumo de agua por individuo, en cambio, se incrementó levemente con el crecimiento de los pollos. Los primeros 5 días de ensayo el consumo de agua promedio presentó valores entre 160 y 210 ml y los siguientes 5 días estuvo entre 200 y 250 ml (Figura 3.24 B).







En cuanto a la ganancia de peso diaria y la conversión alimentaria no se hallaron diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 3.7), indicando que no hubo efectos negativos en parámetros productivos de los pollos por la administración de suero fermentado o sus microorganismos. Por el contrario, se observaron valores levemente mayores de ganancia de peso diaria para los individuos que consumieron estos productos.

**Tabla 3.7:** Parámetros productivos de pollos Ross pm3 de 14 a 24 días de edad.

Tratamiento <sup>1</sup>	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganancia de peso diaria (g) <sup>2</sup>	Conversión alimentaria <sup>3</sup>
Control	375 ± 19 <sup>a</sup>	797 ± 53 <sup>a</sup>	46.8 ± 4.9 <sup>a</sup>	2.83 ± 0.17 <sup>a</sup>
SFG	375 ± 55 <sup>a</sup>	835 ± 78 <sup>a</sup>	51.1 ± 6.6 <sup>a</sup>	2.60 ± 0.46 <sup>a</sup>
SFC	348 ± 29 <sup>a</sup>	805 ± 90 <sup>a</sup>	50.7 ± 7.7 <sup>a</sup>	2.92 ± 0.72 <sup>a</sup>
MSF	353 ± 36 <sup>a</sup>	842 ± 34 <sup>a</sup>	54.2 ± 2.0 <sup>a</sup>	2.60 ± 0.22 <sup>a</sup>

Se presenta el valor promedio ± el desvío estándar de los 6 individuos de cada tratamiento.

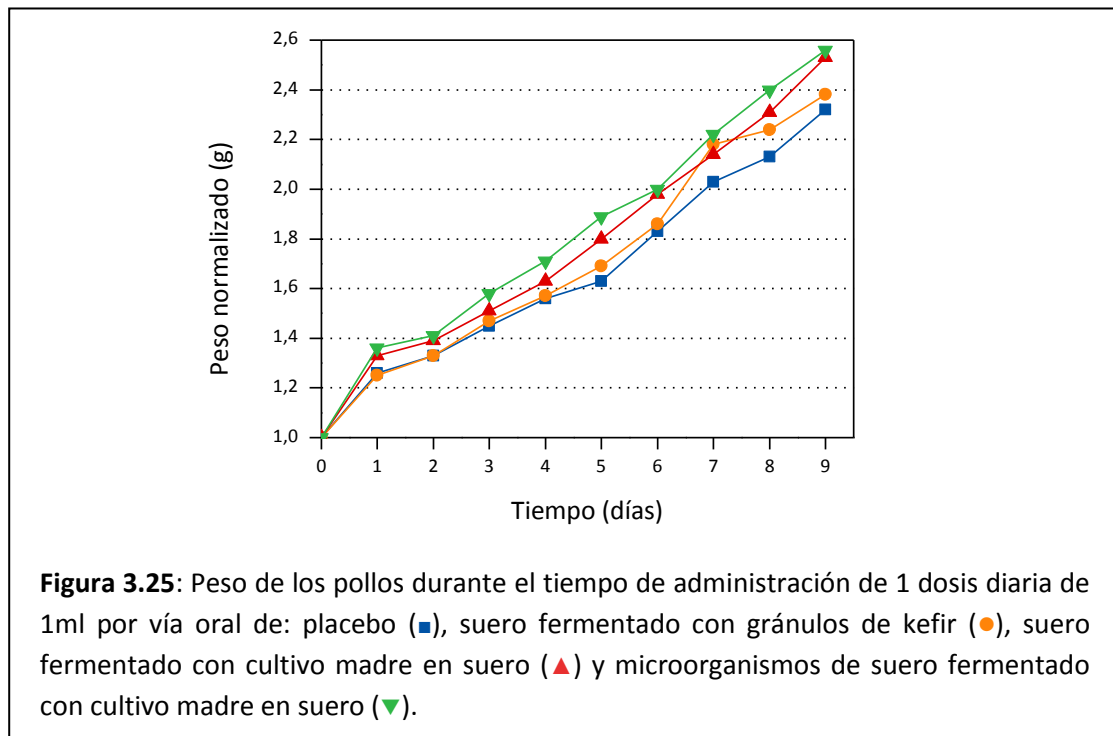
<sup>1</sup>Administración durante 10 días de 1 dosis diaria de 1ml por vía oral de: placebo (control), suero fermentado con gránulos de kefir (SFG), suero fermentado con cultivo de suero (SFC) y microorganismos de suero fermentado con cultivo de suero (MSF)

<sup>2</sup>Ganancia de peso diaria = (peso final-peso inicial)/días

<sup>3</sup>Conversión alimentaria= alimento consumido/(peso final - peso inicial)

Letras iguales en la misma columna significan que no hay diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha=0.05$ )

Se analizó también la evolución del peso durante el periodo de administración de los distintos productos. A fin de evitar las diferencias entre tratamientos debidas a distintos pesos iniciales los datos fueron normalizados dividiendo el peso por el peso inicial.



Se detectó una tendencia a una mayor ganancia relativa de peso en los grupos que consumieron suero fermentado (Figura 3.25). La comparación estadística entre el grupo control y el tratamiento con suero fermentado con gránulos de kefir, que corresponde a la menor dosis de microorganismos administrada, no reveló diferencias significativas entre ambos grupos. Mientras que, cuando se compararon los tratamientos con mayor dosis de microorganismos, tanto en presencia como ausencia de sobrenadante, se detectó un aumento de peso significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) los últimos 3 días de tratamiento con respecto al control.

Los antecedentes del efecto de la administración de kefir sobre la productividad de aves son escasos. Cenesiz y col. (2008) describieron mayor ganancia de peso en pollos que consumieron kefir a *ad libitum* en concentración 7.5 % en agua de bebida, mientras que no observan diferencias significativas en este parámetro al administrarlo al 5 %. Zacconi y col. (2003) demostraron que la administración de kefir en una dosis única de 1 ml el primer día de vida o su consumo durante 12 días *ad libitum* diluido 1:1 en agua de bebida, mejora la conversión alimentaria y la ganancia de peso de los pollos. Otros

autores han observado mejoras en parámetros productivos por administración de kefir en gansos (*Anser anser*) aunque las diferencias no resultan estadísticamente significativas (Yaman y col., 2006; Hesna Sahin y Yardimci, 2009).

Considerando en conjunto los parámetros productivos analizados en el presente trabajo no puede afirmarse que el consumo de suero fermentado presenta un efecto promotor del crecimiento de las aves. Sin embargo, dada la tendencia observada, y considerando las grandes desviaciones debido al pequeño tamaño de muestra sería interesante evaluar el efecto empleando mayor número de individuos a fin de garantizar una mejor comprensión de la influencia de estos tratamientos en la productividad.

Telg y Caldwell (2009) analizando la influencia del consumo de un probiótico en los parámetros productivos de pollos observaron que la utilización de 20 individuos por tratamiento no era suficiente para extraer resultados concluyentes ya que, dada la desviación entre individuos, obtenían diferencias comercialmente valiosas aunque no estadísticamente significativas.

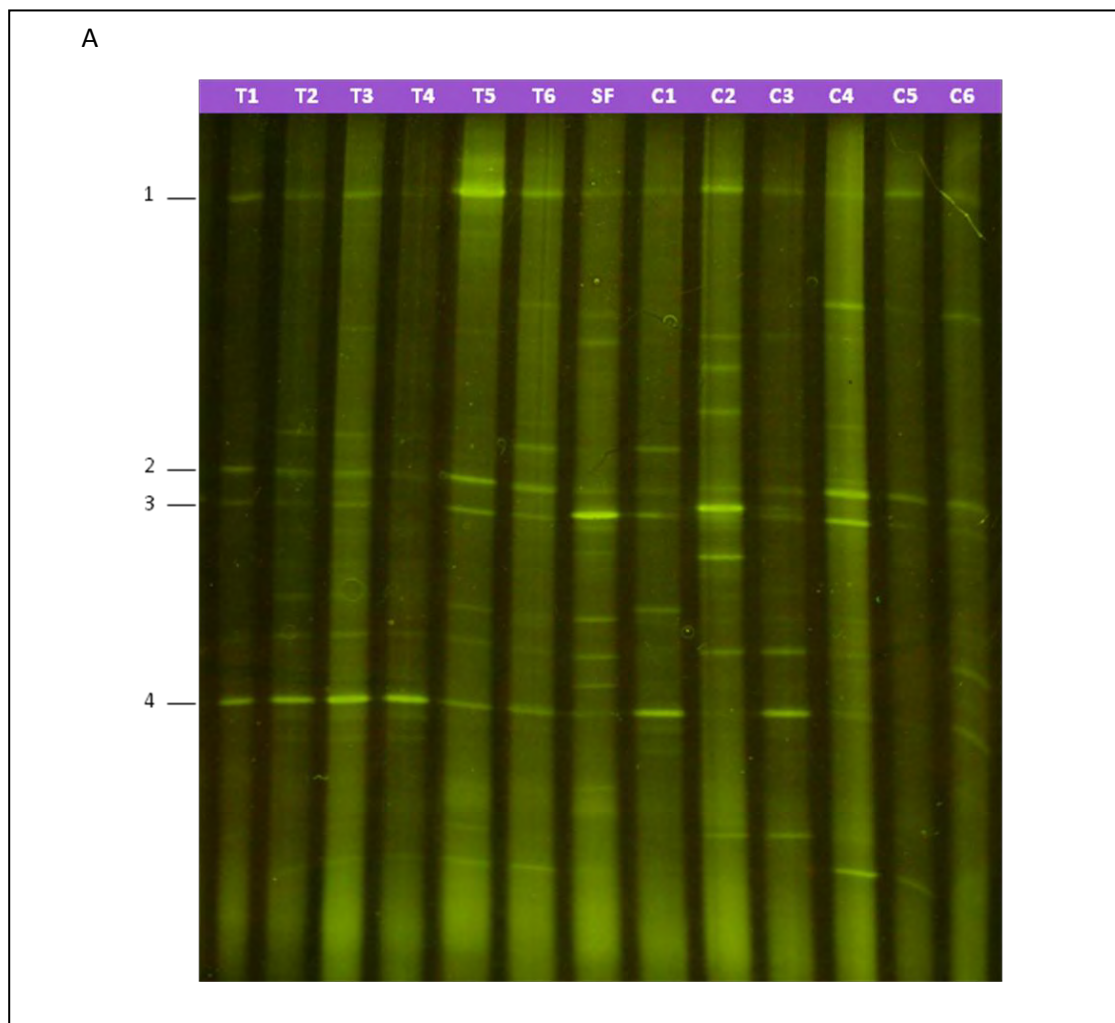
Esto mismo queda en evidencia al analizar las escasas diferencias en parámetros productivos entre individuos control y tratados que resultan significativas en ensayos a campo. Awad y col. (2009) hallaron que la administración de un probiótico constituido por *Lactobacillus* sp. homofermentativos y heterofermentativos adicionados al alimento ( $10^8$  UFC/tonelada) produce mejoras en la ganancia de peso diaria y en la conversión alimentaria. Las diferencias entre los valores presentados por estos autores entre el grupo control y el tratado, calculado sobre un total de 200 individuos por tratamiento, son de 0.33 g en la ganancia de peso y de 0.04 en la de conversión alimentaria. Alkhalif y col. (2010) reportan que la administración del probiótico comercial Bactocell<sup>®</sup> aumenta significativamente el rendimiento de pollos parrilleros, hallando una diferencia en la ganancia de peso entre el grupo control y el tratado de 4.3 g y de conversión alimentaria de 0.14 calculados sobre un total de 200 individuos por tratamiento.

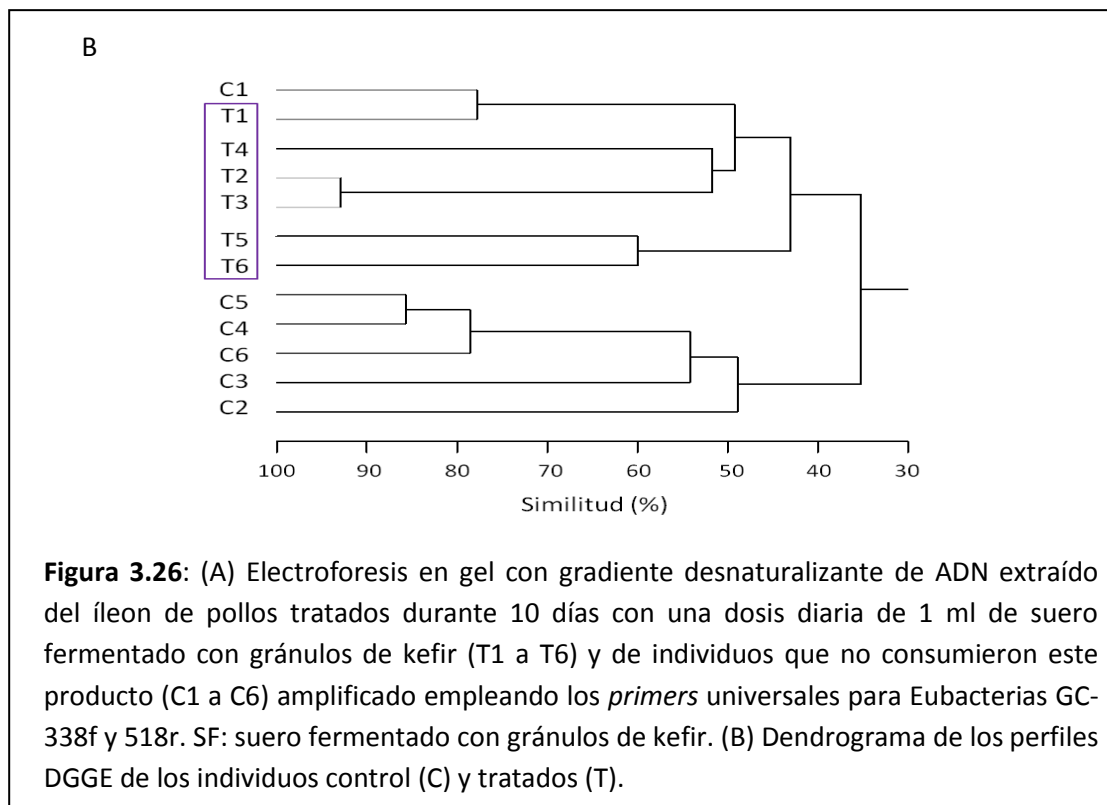
## **2. Análisis de la microbiota intestinal por electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)**

Se evaluó mediante DGGE la diversidad de Eubacterias, empleando *primers* universales (GC-338f/518r), y la de *Lactobacillus* sp., empleando *primers* específicos (Lac1/GC-Lac2),

del íleon de pollos. Los ensayos se realizaron sobre muestras de animales tratados durante 10 días con una dosis diaria definida de 1 ml de suero fermentado con gránulos de kefir aplicada en el pico de cada individuo (tratados) y de individuos no tratados (control).

Los perfiles DGGE de la comunidad bacteriana del íleon de individuos control y tratados se presentan en la Figura 3.26. Se observaron patrones de compuestos por 5 a 14 bandas dependiendo del individuo analizado. Aquellos pertenecientes al grupo que consumió suero fermentado presentaron entre 7 y 14 bandas (Figura 3.26 A calles T1 a T6). El número de bandas en los perfiles de los individuos control fue menor, detectándose entre 5 y 8 en cada perfil (Figura 3.26 A calles C1 a C6). Algunas bandas fueron comunes a todos los perfiles mientras que otras predominaron en los grupos tratados o control. La similitud entre los perfiles de bandas de distintos individuos se presenta en forma de dendrograma (Figura 3.26 B).





Los perfiles de bandas DGGE de individuos tratados agruparon en un clúster diferente que las de los individuos control, a excepción del individuo C1 que agrupó con los tratados. Esto indica que el tratamiento produjo variaciones en la composición de especies bacterianas de la comunidad microbiana del íleon.

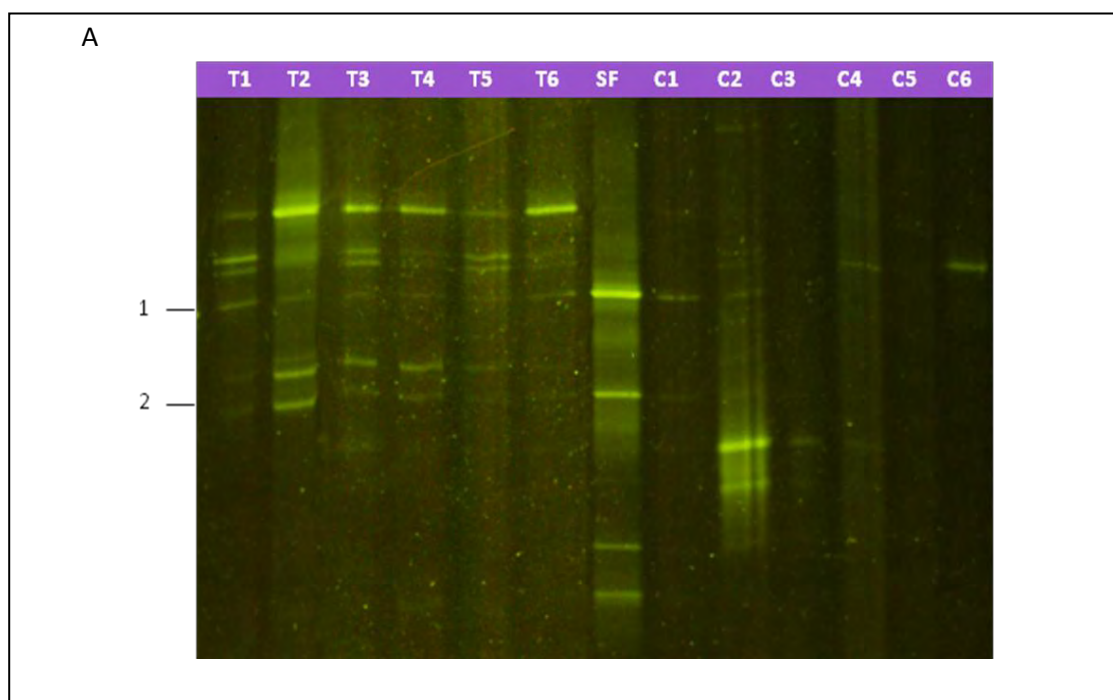
Se incluyó en el gel una calle con el perfil de bacterias presentes en el suero fermentado con gránulos de kefir a fin de analizar si podía detectarse la colonización intestinal de alguna bacteria presente en este producto en los individuos tratados que no formara parte de la microbiota habitual y que por consiguiente no estuviera en aquellos del grupo control. Sólo se halló coincidencia en la posición de 4 bandas del suero fermentado con bandas del perfil de todos los individuos, tanto pertenecientes al grupo control como al grupo tratado, las mismas están señaladas con números del 1 al 4 en la Figura 3.26 A. Debido a los estudios realizados previamente se sabe que las bandas 1 a 3 del perfil DGGE de suero fermentado corresponden a *Lactobacillus kefiranofaciens*, mientras que la banda 4 corresponde a *Lactobacillus kefir*. Estas especies no forman parte de la microbiota habitual del íleon de pollos y por lo tanto su alineamiento con bandas de individuos no tratados, y posiblemente también con las de aquellos tratados, podría deberse a una superposición de bandas entre especies diferentes, tal como fue

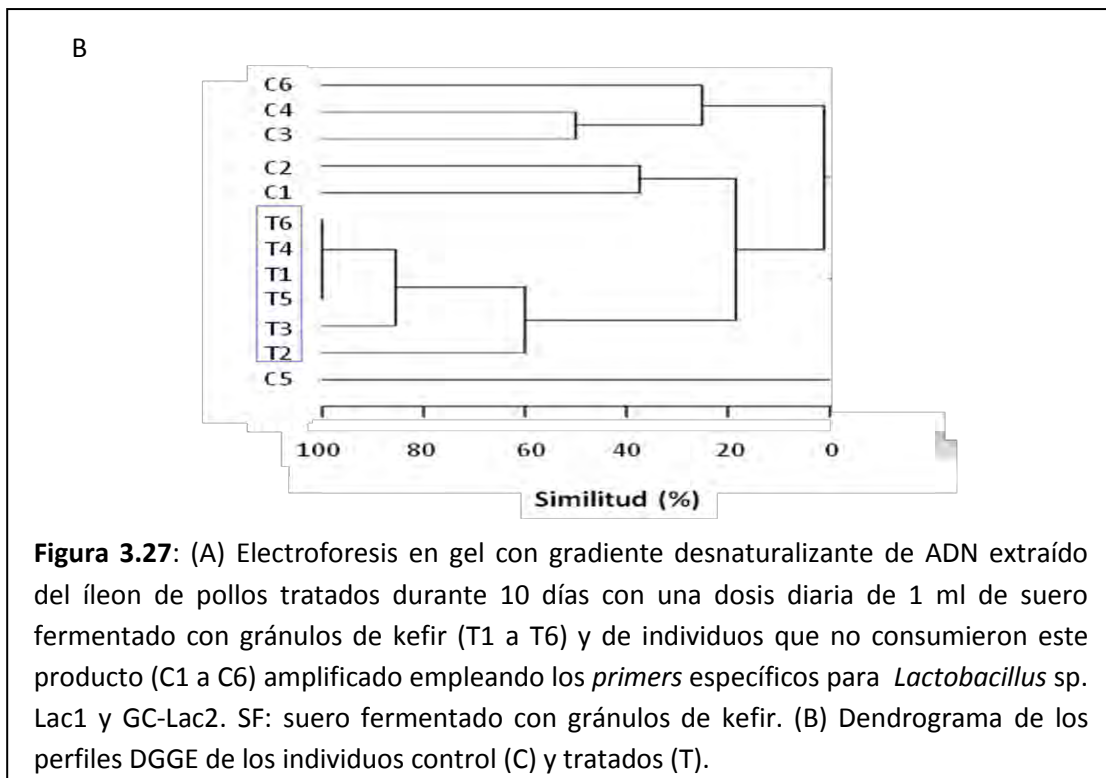
discutido en el Capítulo 1. Debería completarse el análisis determinando la identidad de dichas bandas por secuenciación.

Se analizó también la diversidad de microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus* sp. en el íleon de pollos tratados y control empleando los *primers* específicos Lac 1 y GC-Lac2. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 3.27.

Los perfiles DGGE de *Lactobacillus* sp. del íleon de individuos tratados con suero fermentado presentaron mayor cantidad de bandas que los perfiles del grupo control (Figura 3.27 A). Los perfiles de los individuos que recibieron el tratamiento presentaron además una similitud de 60 a 100 %, mientras que los pollos del grupo control tuvieron perfiles DGGE disímiles entre sí (Figura 3.27 B).

Por otro lado se observó coincidencia de 2 bandas del perfil de suero fermentado con bandas de los perfiles de todos los individuos tratados, indicadas con los números 1 y 2 en la Figura 3.27 A. La banda 1 del perfil DGGE de suero fermentado corresponde a *Lactobacillus kefiranofaciens*, mientras que la banda 2 corresponde a *Lactobacillus kefir* determinado por secuenciación de cada banda. Estas bandas no se observaron en ninguno de los perfiles de individuos del grupo control a excepción del individuo C1. Este resultado se corresponde con la similitud, previamente señalada, de la comunidad microbiana del íleon de este individuo con la de aquellos tratados (Figura 3.26 B).





Los resultados hallados empleando *primers* específicos para *Lactobacillus* sp. están en concordancia con los obtenidos por la utilización de *primers* universales para bacterias, indicando la posibilidad de que *L. kefir* y *L. kefiranofaciens* presentes en el suero fermentado colonicen el tracto gastrointestinal de los pollos que lo consumen. Sin embargo debido a que es posible que bandas coincidentes no correspondan a la misma especie, sería necesaria la secuenciación de las bandas para confirmar esta observación. Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con suero fermentado durante 10 días consecutivos modifica la comunidad bacteriana, y particularmente la de lactobacilos, del íleon de pollos.

La comunidad microbiana del íleon está compuesta por aproximadamente  $10^9$  bacterias predominando microorganismos anaerobios facultativos pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Enterococcus* (Lu, 2003; Yin y col., 2010). La diversidad de bacterias de esta porción del tracto intestinal ha sido extensamente estudiada debido a que es afectada en gran medida por la ingesta (Gong y col., 2008). Los cambios en la composición microbiana del íleon a su vez influyen en la función intestinal, incluyendo la digestión y absorción de nutrientes, que afectan la tasa de crecimiento (Apajalahti y col., 2004).

Las modificaciones en la microbiota del íleon halladas en el presente trabajo por la administración de suero fermentado no pudieron asociarse a una mejoría en los parámetros productivos de las aves. De manera similar a lo observado en el presente estudio Yaman y col. (2006) demostraron que la administración de kefir en dilución 0.2 y 0.5 % en agua de bebida afecta el balance de la microbiota intestinal de gansos (*Anser anser*). Estos autores hallaron una disminución en la concentración de bacterias aeróbicas totales y coliformes y un aumento de la concentración de lactobacilos en heces durante la administración del probiótico. Sin bien estos cambios se asociaron a una mejoría en el rendimiento productivo de las aves, las diferencias tampoco fueron significativas ( $P>0.05$ ).

La microbiota del íleon y los ciegos tiene además un rol importante en la protección contra infecciones bacterianas, siendo estos sitios los preferidos para la colonización de patógenos intestinales (Dunkley y col., 2009). Se estudió seguidamente el efecto de la administración de suero fermentado a pollos en la asociación e invasión de *Salmonella* Enteritidis.

### **3. Antagonismo del suero fermentado sobre la asociación e invasión intestinal de *Salmonella* Enteritidis**

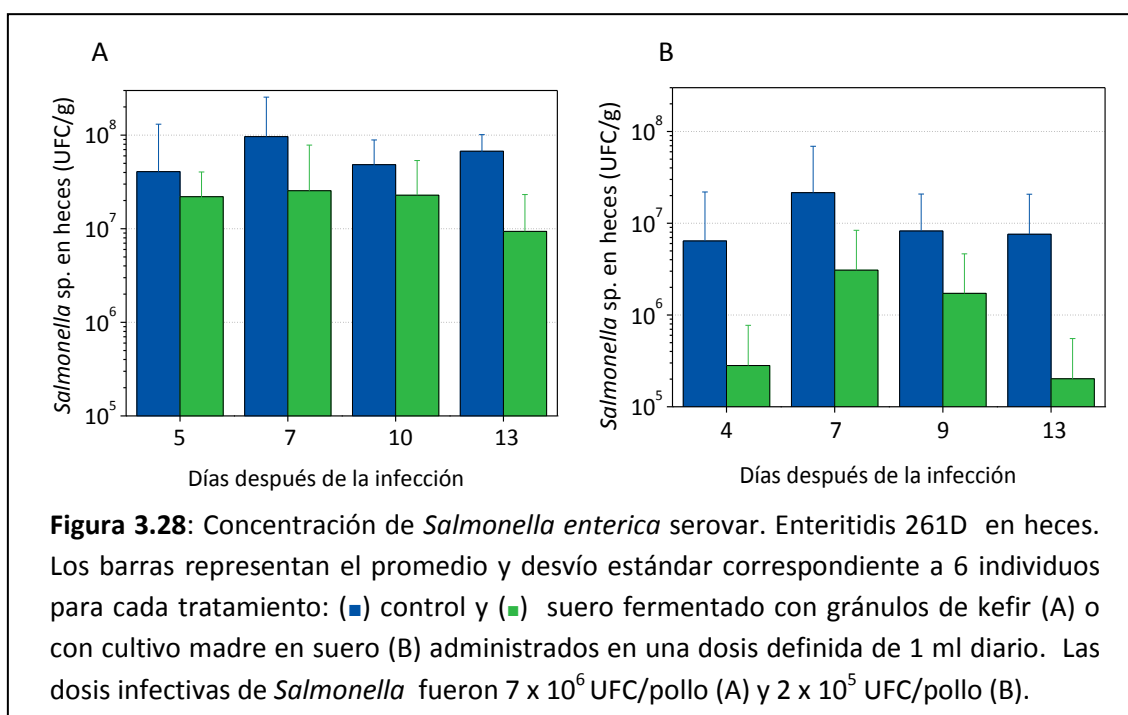
Una vez probada la inocuidad de los productos se procedió a evaluar el efecto de su administración sobre la infección causada por *S. Enteritidis* 261D. Se analizaron 2 formas de administración: aplicando una dosis diaria de 1 ml de producto fermentado en el pico de cada individuo (dosis definida) o adicionando los productos en el agua de bebida (*ad libitum*) (ver detalle en materiales y métodos, sección 6.4). En todos los ensayos los productos fueron administrados durante 6 o 7 días antes de la infección y se continuaron aplicando hasta el final del ensayo. Se evaluó la concentración del patógeno en heces a distintos tiempos luego de la infección y su translocación a bazo e hígado. Paralelamente se analizó el consumo de alimento, el consumo de agua y el peso de los pollos como parámetros indirectos de la salubridad de los mismos.



### 3.1 Efecto de la administración de una dosis controlada de suero fermentado

Se realizaron 2 ensayos en los que se analizaron distintas dosis de probiótico y de *Salmonella* Enteritidis. En el primer ensayo se administró suero fermentado con gránulos de kefir y se empleó una dosis infectiva de *Salmonella* de  $7 \times 10^6$  UFC/pollo. En el segundo ensayo se aumentó la dosis del probiótico administrándose suero fermentado con cultivo madre en suero que contiene 10 veces mayor concentración de BAL (Capítulo 1, Tabla 1.8 vs. Tabla 1.14) y se disminuyó la dosis de patógeno a  $2 \times 10^5$  UFC/pollo.

La concentración de *Salmonella* en heces fue mayor para los pollos infectados con una dosis más alta del patógeno (Figura 3.28 A vs. B). Cuando la dosis infectiva fue de  $7 \times 10^6$  UFC/pollo la concentración promedio del patógeno en heces de individuos del grupo control se encontró entre  $0.3$  y  $1 \times 10^8$  UFC/g en todos los tiempos evaluados. Al aplicar una dosis de *Salmonella* de  $2 \times 10^5$  UFC/pollo estos valores estuvieron entre  $0.5$  y  $2 \times 10^7$  UFC/g. Los resultados indican que el patógeno colonizó el intestino y persistió en el mismo durante 13 días después de la infección.



Los individuos tratados con ambos productos fermentados presentaron valores promedio de *Salmonella* en heces menores que los individuos control. Esta diferencia fue mayor cuando se aumentó la concentración de microorganismos probióticos administrados y se disminuyó la dosis infectiva de *Salmonella* (Figura 3.28 A vs. B). Si

bien los recuentos del patógeno en heces fueron sistemáticamente menores en los individuos que consumieron probiótico, la diferencia no resultó significativa habiendo una alta variabilidad entre individuos para el parámetro evaluado.

La dosis más frecuentemente utilizada de probióticos en aves se halla en el rango de  $10^8$  a  $10^9$  UFC/pollo por día (Patterson y Burkholder, 2003). Sin embargo la misma varía dependiendo del producto y resultados de distintos autores indican que un nivel mayor de administración no siempre conduce a un efecto más acentuado. Los resultados obtenidos en el presente estudio con suero fermentado indican que la protección aumenta al elevar la dosis diaria de  $10^7$  UFC/pollo a  $10^8$  UFC/pollo.

Se analizó posteriormente el efecto de la administración del suero fermentado en el pasaje del patógeno a órganos internos. Se ha descrito que la capacidad de *Salmonella* Enteritidis de colonizar el intestino y de invadir difiere entre cepas con distinta virulencia (Gast y Benson, 1996). *S. Enteritidis* 261D presentó una alta capacidad de translocar a bazo e hígado a las dos dosis infectivas ensayadas (Tabla 3.8). No se observó protección de la translocación de *Salmonella* Enteritidis a bazo, mientras que la prevalencia del patógeno en hígado disminuyó en individuos tratados con suero fermentado con gránulos de kefir y con cultivo madre en suero (Tabla 3.8).

**Tabla 3.8:** Efecto de la administración de suero fermentado en la prevalencia de *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis 261D en bazo e hígado.

Tratamientos	Dosis infectiva (UFC/pollo)	Bazo	Hígado
Control	<sup>3</sup> $7 \times 10^6$	5/6 (83 %)	5/6 (83 %)
Suero fermentado con gránulos de kefir <sup>1</sup>	<sup>3</sup> $7 \times 10^6$	5/6 (83 %)	1/6 (17 %)
Control	<sup>4</sup> $2 \times 10^5$	3/6 (50 %)	6/6 (100 %)
Suero fermentado con cultivo madre en suero <sup>2</sup>	<sup>4</sup> $2 \times 10^5$	3/6 (50 %)	3/6 (50 %)

La prevalencia se midió como el N° de individuos positivos / N° total (%).

<sup>1</sup> Administrado en 1 dosis diaria de 1ml en el pico a pollos de 13 días de edad durante 18 días.

<sup>2</sup> Administrado en 1 dosis diaria de 1ml en el pico a pollos de 10 días de edad durante 20 días.

<sup>3</sup> La infección se realizó el día 6 de tratamiento. La translocación del patógeno fue medida el día 12 luego de la infección.

<sup>4</sup> La infección se realizó el día 7 de tratamiento. La translocación del patógeno fue medida el día 13 luego de la infección.

Se calcularon distintos parámetros de productividad a fin de evaluar el estado general de las aves infectadas que consumieron suero fermentado respecto de aquellas que no

recibieron el tratamiento y fueron o no infectados con el patógeno. Se observó que la infección con *Salmonella* no afectó el rendimiento productivo de las aves. No se hallaron diferencias significativas en la ganancia de peso diaria y la conversión alimentaria entre los tratamientos a ninguna de las dos dosis infectivas de *Salmonella* Enteritidis evaluadas (Tabla 3.9).

**Tabla 3.9:** Parámetros productivos de pollos tratados con suero fermentado e infectados con *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis 261D en relación a pollos que no recibieron el tratamiento y fueron o no infectados con el patógeno.

Tratamiento	Dosis infectiva (UFC/pollo)	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganancia de peso diaria (g) <sup>3</sup>	Conversión alimentaria <sup>4</sup>
<b>SFG</b> (ensayo 2) <sup>1</sup>	<b>7 x10<sup>6</sup></b>	560 ± 45 <sup>a</sup>	<b>1327 ± 59<sup>a</sup></b>	59.0 ± 3.3 <sup>a</sup>	2.83 ± 0.48 <sup>a</sup>
Control de infección	7 x10 <sup>6</sup>	539 ± 80 <sup>a</sup>	1298 ± 152 <sup>a</sup>	58.4 ± 6.7 <sup>a</sup>	3.36 ± 0.84 <sup>a</sup>
Control sin infectar	-	641 ± 60 <sup>a</sup>	1413 ± 193 <sup>a</sup>	59.3 ± 10.7 <sup>a</sup>	2.91 ± 0.74 <sup>a</sup>
<b>SFC</b> (ensayo 3) <sup>2</sup>	<b>2 x10<sup>5</sup></b>	483 ± 69 <sup>a</sup>	<b>1108 ± 173<sup>a</sup></b>	48.1 ± 8.4 <sup>a</sup>	2.58 ± 0.25 <sup>a</sup>
Control de infección	2 x10 <sup>5</sup>	469 ± 67 <sup>a</sup>	1073 ± 152 <sup>a</sup>	46.5 ± 8.0 <sup>a</sup>	2.78 ± 0.59 <sup>a</sup>
Control sin infectar	-	481 ± 58 <sup>a</sup>	1084 ± 161 <sup>a</sup>	46.3 ± 8.7 <sup>a</sup>	2.87 ± 0.32 <sup>a</sup>

Se presenta el valor promedio ± desvío estándar de los 6 individuos de cada tratamiento. Los parámetros se calcularon luego de la infección. Letras iguales dentro de la misma columna correspondientes al mismo ensayo significan que no hay diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha=0.05$ ).

<sup>1</sup> **SFG**: suero fermentado 24 h a 20 °C con gránulos de kefir, administrado en 1 dosis diaria de 1ml en el pico a pollos de 13 días de edad durante 18 días. La infección con *Salmonella* Enteritidis 261D se realizó el día 6 de tratamiento.

<sup>2</sup> **SFC**: suero fermentado 24 h a 20 °C con cultivo madre en suero administrado en 1 dosis diaria de 1ml en el pico a pollos de 10 días de edad durante 20 días. La infección con *Salmonella* Enteritidis 261D se realizó el día 7 de tratamiento.

<sup>3</sup> Ganancia de peso diaria = (peso final-peso inicial)/días

<sup>4</sup> Conversión alimentaria= alimento consumido/(peso final-peso inicial)

Los valores de concentración de patógeno en las heces y los altos porcentajes de translocación indican que *Salmonella* Enteritidis 261D colonizó el tracto gastrointestinal con invasión a bazo e hígado. Sin embargo no se observan modificaciones en parámetros productivos de los individuos enfermos. Esto puede deberse a que la mayoría de los pollos mayores a 14 días de edad colonizados por *S. Enteritidis* se transforman en portadores y permanecen asintomáticos (Velge y col., 2005; Golden y col., 2008). Al igual que lo hallado en el presente estudio, Vilà y col. (2009) no detectaron diferencias en parámetros productivos, analizados durante 42 días, entre

pollos infectados con *Salmonella* Enteritidis ( $10^6$  UFC/pollo) respecto a pollos sin infectar.

El consumo total de alimento y agua durante el ensayo tampoco se modificó por el tratamiento con suero fermentado, ni por la infección con *Salmonella* (Tabla 3.10).

**Tabla 3.10:** Consumo total de agua y alimento por individuo

Tratamiento	Dosis infectiva (UFC/pollo)	Consumo total de agua (L)	Consumo total de alimento (kg)
<b>SFG</b> (ensayo 2) <sup>1</sup>	<b>7 x10<sup>6</sup></b>	2.76 ± 0.30 <sup>a</sup>	2.16 ± 0.33 <sup>a</sup>
Control de infección	7 x10 <sup>6</sup>	2.69 ± 0.36 <sup>a</sup>	2.20 ± 0.55 <sup>a</sup>
Control sin infectar	-	2.60 ± 0.20 <sup>a</sup>	2.52 ± 0.41 <sup>a</sup>
<b>SFC</b> (ensayo 3) <sup>2</sup>	<b>2 x10<sup>5</sup></b>	2.53 ± 0.45 <sup>a</sup>	1.79 ± 0.27 <sup>a</sup>
Control de infección	2 x10 <sup>5</sup>	2.30 ± 0.45 <sup>a</sup>	1.64 ± 0.23 <sup>a</sup>
Control sin infectar	-	2.61 ± 0.64 <sup>a</sup>	1.72 ± 0.33 <sup>a</sup>

Se presenta el valor promedio ± desvío estándar de los 6 individuos de cada tratamiento. Los parámetros se calcularon luego de la infección.

<sup>1</sup> SFG: suero fermentado con gránulos de kefir, administrado en 1 dosis diaria de 1ml en el pico a pollos de 13 días de edad durante 18 días. La infección con *Salmonella* Enteritidis 261D se realizó el día 6 de tratamiento.

<sup>2</sup> SFC: suero fermentado con cultivo de suero administrado en 1 dosis diaria de 1ml en el pico a pollos de 10 días de edad durante 20 días. La infección con *Salmonella* Enteritidis 261D se realizó el día 7 de tratamiento.

Letras iguales dentro de la misma columna correspondientes al mismo ensayo significan que no hay diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha=0.05$ ).

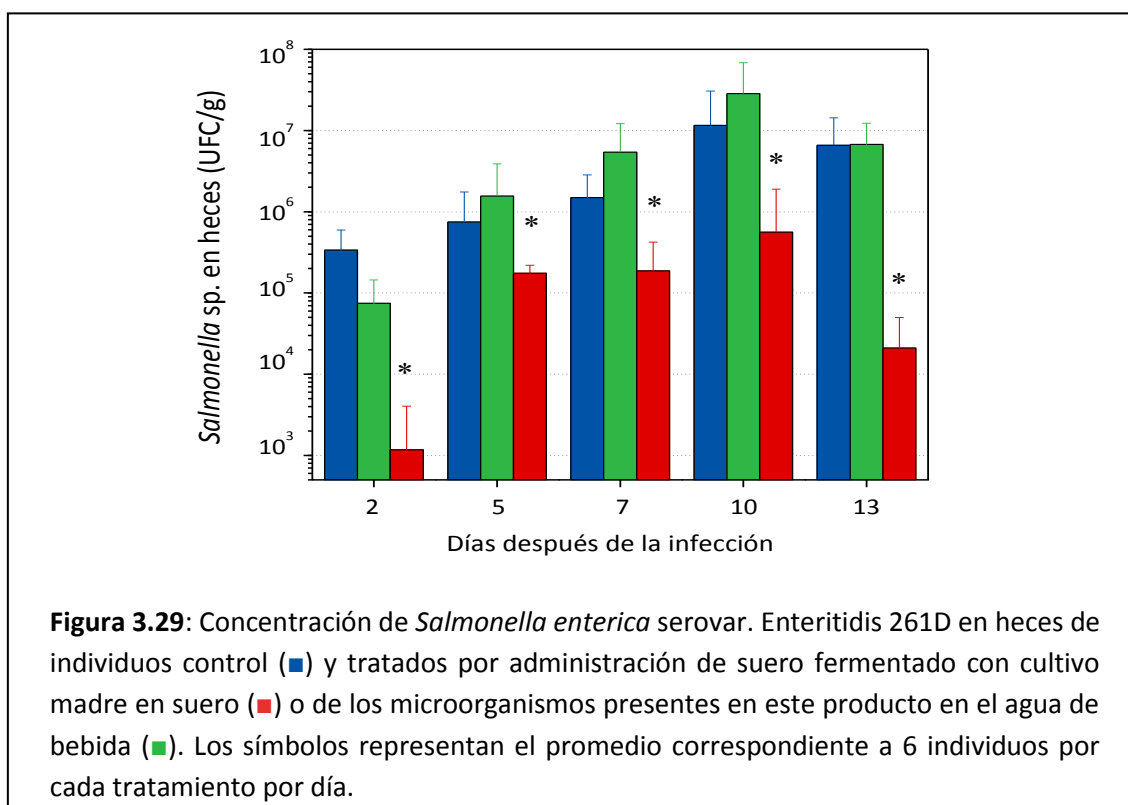
### 3.2 Efecto de la administración de suero fermentado *ad libitum*

Se evaluó la administración *ad libitum* del suero fermentado durante 19 días. Se realizaron 2 tratamientos adicionando suero fermentado con cultivo madre en suero o sólo los microorganismos presentes en este producto resuspendidos en buffer fosfato. Ambos productos se aplicaron en dilución 1:100 en el agua de bebida. Como control se emplearon individuos que bebieron sólo agua. Todos los grupos fueron desafiados con una dosis de  $2 \times 10^5$  UFC/pollo de *Salmonella* Enteritidis 261D el día 7 del ensayo.

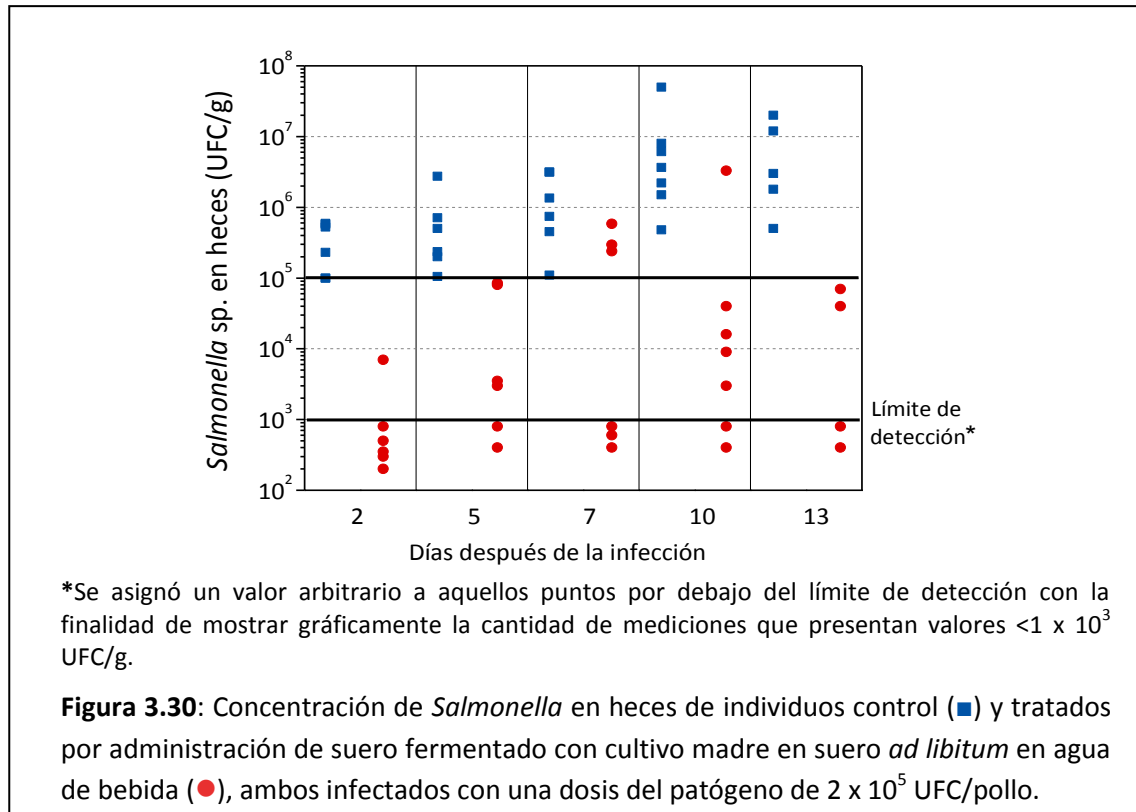
La supervivencia de los microorganismos en agua fue evaluada previamente al inicio del ensayo, determinándose que no hubo variación de la concentración de bacterias ni levaduras viables luego de 24 horas de incubación a 25° C. La concentración de BAL en el agua en el agua de bebida fue  $1 \times 10^6$  UFC/ml y la de levaduras  $1 \times 10^5$  UFC/ml.

La dosis de microorganismos administrada aumentó progresivamente con el crecimiento del animal debido a la variación en el consumo de agua, entre 150 y 300 ml a lo largo del ensayo. Se calculó que la cantidad diaria de bacterias ácido lácticas administrada fue  $1.5$  a  $3 \times 10^9$  UFC/pollo y la de levaduras  $1.5$  a  $3 \times 10^8$  UFC/pollo.

Respecto a la concentración de *Salmonella* en heces no se hallaron diferencias significativas entre el grupo control y el tratado con microorganismos del suero fermentado con cultivo madre. Sin embargo el tratamiento con suero fermentado con cultivo de madre en suero (microorganismos + productos metabólicos de la fermentación) en agua de bebida disminuyó significativamente el recuento de *Salmonella* en heces respecto al control todos los días evaluados (Figura 3.29).



La concentración de *Salmonella* en heces en los individuos del grupo control fue, en las 30 determinaciones realizadas (5 días para 6 individuos) superior a  $1 \times 10^5$  UFC/g, mientras que en el grupo tratado con suero fermentado con cultivo madre de las 30 determinaciones realizadas, 26 se encontraron por debajo de  $1 \times 10^5$  UFC/g y 13 por debajo del límite de detección ( $1 \times 10^3$  UFC/g) (Figura 3.30).



Estos resultados indican que la administración de suero fermentado en agua de bebida afecta la capacidad de *Salmonella* Enteritidis de colonizar y persistir en el tracto gastrointestinal luego de la infección. Esto no se observó cuando se administraron sólo los microorganismos de este producto, lo que indica que los metabolitos presentes en el suero intervendrían en el efecto protector.

**Tabla 3.11:** Efecto de la administración de suero fermentado *ad libitum* en agua de bebida en la prevalencia de *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis en bazo e hígado.

Tratamientos <sup>1</sup>	Bazo	Hígado
Control	4/6 (67 %)	6/6 (100 %)
Suero fermentado con cultivo madre de suero (SFC)	6/6 (100 %)	4/6 (67 %)
Microorganismos de SFC	5/6 (83 %)	2/6 (33 %)

La prevalencia se midió como el N° de individuos positivos / N° total (%).  
<sup>1</sup> Los tratamientos fueron administrados en agua de bebida en una dilución 1:100 a pollos de 16 días de edad durante 19 días. La infección con  $2 \times 10^5$  UFC/pollo se realizó el día 7 del ensayo. La translocación del patógeno fue medida el día 13 luego de la infección.

La translocación de *Salmonella* Enteritidis a bazo no se redujo por los tratamientos. Sin embargo, en los grupos que consumieron tanto de suero fermentado como los

microorganismos de este producto en agua de bebida se observó una tendencia a una menor translocación de *S. Enteritidis* a hígado (Tabla 3.11) tal como se halló al administrar los productos en una dosis controlada.

Con respecto a los parámetros productivos, para ninguno de los tratamientos, se hallaron diferencias significativas (Tabla 3.12).

**Tabla 3.12:** Parámetros productivos y consumo de alimento de pollos de 16 días de edad tratados durante 19 días por administración *ad libitum* de suero fermentado con cultivo madre en suero (SFC) o de los microorganismos de este producto (MSF) y contaminados el día 7 de tratamiento con  $2 \times 10^6$  UFC/pollo de *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis 261D.

Tratamiento	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganancia de peso diaria (g) <sup>1</sup>	Conversión alimentaria <sup>2</sup>	Consumo total de alimento (kg)
Control	409 ± 48 <sup>a</sup>	1517 ± 190 <sup>a</sup>	58.3 ± 8.3 <sup>a</sup>	2.32 ± 0.20 <sup>a</sup>	2.56 ± 0.34 <sup>a</sup>
SFC	489 ± 27 <sup>a</sup>	1648 ± 134 <sup>a</sup>	61.0 ± 7.6 <sup>a</sup>	2.38 ± 0.26 <sup>a</sup>	2.74 ± 0.31 <sup>a</sup>
MSF	455 ± 54 <sup>a</sup>	1564 ± 128 <sup>a</sup>	58.4 ± 3.9 <sup>a</sup>	2.24 ± 0.24 <sup>a</sup>	2.50 ± 0.40 <sup>a</sup>

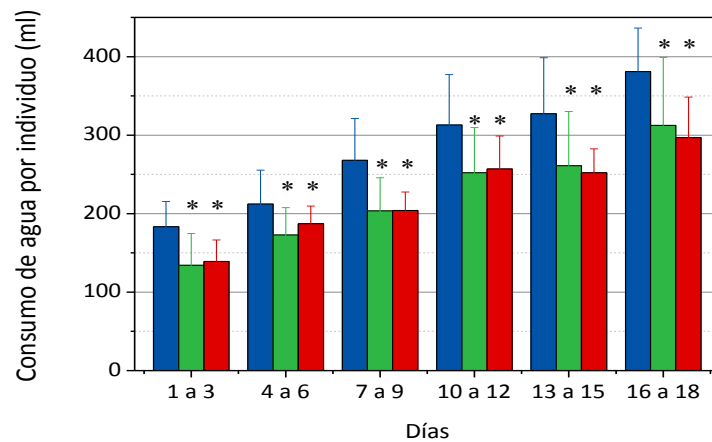
<sup>1</sup> Ganancia de peso diaria = (peso final-peso inicial)/días.

<sup>2</sup> Conversión alimentaria= alimento consumido/(peso final-peso inicial)

Letras iguales dentro de la misma columna significan que no hay diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha=0.05$ )

El consumo de agua diario fue 30 a 50 ml menor para individuos que bebieron agua adicionada con suero fermentado o con los microorganismos de este producto que para individuos del grupo control, hallándose diferencias significativas en el consumo a lo largo de todo el ensayo (Figura 3.31). Esto podría deberse al menor pH del agua adicionada con suero fermentado (pH 4.8) y microorganismos (pH 5.5) que sin adicionar (pH 7).

A pesar de esta diferencia en el consumo de agua, los parámetros productivos y el consumo total de alimento no difirieron significativamente entre los grupos tratados con suero fermentado o sus microorganismos *ad libitum* (Tabla 3.12).



**Figura 3.31:** Consumo de agua por individuo. (■) Grupo control y grupos tratados por administración en el agua de bebida de (■) suero fermentado con cultivo madre en suero o (■) de los microorganismos presentes en este producto. Se presenta el promedio y desvío estándar de 6 individuos por tratamiento por día calculado cada 3 días.

De manera similar a lo hallado en este estudio Timmerman y col. (2006) describieron un menor consumo de agua en individuos que ingerían un probiótico constituido por lactobacilos aislados del intestino de aves por esta vía, atribuyéndolo al sabor de los ácidos orgánicos. Estos autores también describieron inconvenientes en la obstrucción de los bebederos por metabolitos del producto que sedimentaban. Como solución administraron solo los microorganismos del probiótico resuspendidos en buffer. En este estudio, sin embargo, se demuestra que los metabolitos del suero fermentado intervienen en el efecto protector del producto contra *Salmonella* Enteritidis.

Es posible que la presencia de ácidos orgánicos en el suero fermentado intervenga en el efecto protector. La adición de ácidos orgánicos en agua o alimento es una práctica utilizada para controlar *Salmonella* en la industria avícola (Van Immerseel y col., 2003; 2006). Se ha descrito que la adición de 0.5 % de ácido láctico a agua de bebida de pollos infectados con *Salmonella* durante las horas de ayuno previas al sacrificio reduce la incidencia y concentración del patógeno en el buche (Byrd y col., 2001). También se ha informado que el consumo de lactosa, disminuye la translocación de *Salmonella* Enteritidis a órganos internos de pollos causando cambios morfológicos en la mucosa, un descenso del pH luminal y un aumento de la concentración de ácido acético, propiónico, butírico y láctico (Tellez y col., 1993).



Los resultados hallados en este trabajo indican la importancia de la forma de administración del suero fermentado en la efectividad para reducir la infección por *Salmonella* Enteritidis. Se encontró mejor efectividad por aplicación del producto *ad libitum* en el agua de bebida que en una dosis definida en el pico del ave. Asimismo se demostró que el suero fermentado y no sólo los microorganismos presentes en el mismo son responsables del efecto antagónico observado sobre *Salmonella*.

## CONCLUSIONES

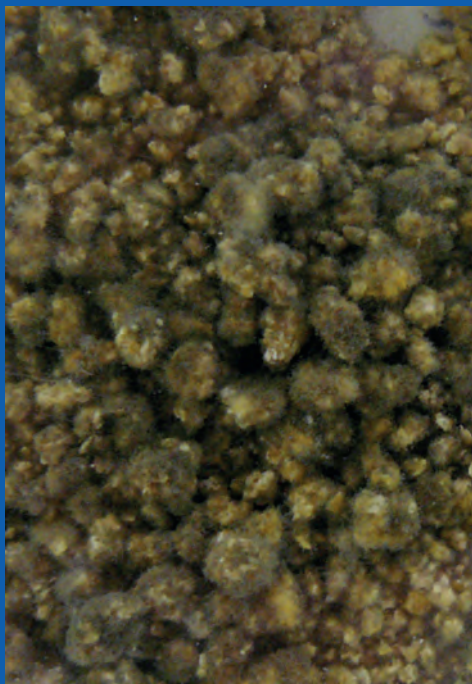
- El modelo experimental de monocapa de células intestinales Caco-2/TC7 permitió estudiar la capacidad de adhesión de los microorganismos presentes en suero fermentado con gránulos o cepas aisladas de kefir. Asimismo permitió caracterizar la asociación e invasión de tres cepas de *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis.
- La adhesión de las bacterias lácticas y levaduras presentes en el suero fermentado a la monocapa no disminuye la asociación de *Salmonella* Enteritidis.
- La preincubación de *Salmonella* Enteritidis con los microorganismos presentes en el suero fermentado con gránulos de kefir protege a las células Caco-2/TC7 de la asociación e invasión del patógeno cuando la relación es 100 bacterias ácido lácticas y 10 levaduras por cada *Salmonella*.
- Cuando *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327, *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 y *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154, crecidos en cultivo mixto en suero, son preincubados con *Salmonella* Enteritidis reducen su capacidad de asociarse e invadir células Caco-2/TC7. Sin embargo la protección es menor que cuando el patógeno se preincuba con la totalidad de la comunidad microbiana presente en el suero fermentado con gránulos de kefir.
- La preincubación de *Salmonella* Enteritidis con sobrenadantes de suero fermentado con gránulos de kefir y con el cultivo mixto de *L. plantarum* CIDCA 8327, *L. kefir* CIDCA 8348 y *K. marxianus* CIDCA 8154 disminuye significativamente su capacidad de invadir células epiteliales intestinales.
- El consumo de suero fermentado con gránulos de kefir y con cultivo madre en suero no afecta la ingesta de alimento, el consumo de agua, la humedad de las

heces, ni la conversión alimentaria en pollos parrilleros, aunque modifica la comunidad bacteriana, particularmente los lactobacilos, del íleon.

- La administración de *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis 261D en una dosis única de  $10^5$  o de  $10^6$  UFC/pollo a pollos Ross pm3 de 19 a 23 días de edad, no afecta el consumo de agua, el consumo de alimento, ni los parámetros productivos de los mismos, aún cuando el patógeno coloniza el intestino y transloca a hígado y bazo.
- La administración de suero fermentado con gránulos de kefir y con cultivo madre en una dosis diaria controlada no disminuye significativamente la concentración de *Salmonella* en heces aunque reduce la translocación del patógeno a hígado.
- La administración de suero fermentado con cultivo madre *ad libitum* en agua de bebida resulta más efectiva que su administración en una dosis controlada, reduciendo significativamente la concentración del patógeno en heces y su translocación a hígado.
- Los metabolitos presentes en el producto y no sólo los microorganismos contenidos en el mismo son responsables del efecto antagónico del suero fermentado sobre *Salmonella* Enteritidis.

## Capítulo 4: Bioconservación de pienso para aves por adición de suero fermentado

---



## INTRODUCCIÓN

El alimento es el principal componente del total de costos de la producción de carne y huevos en la industria aviaría. Asimismo es el principal agente a través del cual las aves son expuestas a una amplia variedad de factores a través del tracto gastrointestinal.

Se han descrito que alimentos para pollos elaborados en nuestro país presentan una alta incidencia de hongos toxigénicos. Los géneros que presentan mayor frecuencia son *Aspergillus* (53-85 %), *Penicillium* (98 %) y *Fusarium* (70-87 %) (Dalcero y col., 1997; 1998). Dalcero y col. (1997) describieron que las especies prevalentes son *F. moniliforme* (73 %), *F. subglutinans* (35 %), *F. graminearum* (20 %), *A. parasiticus* (33 %) y *A. flavus* (8 %), y es sabido que cepas de algunas de estas especies son capaces de producir algunas de las micotoxinas más nocivas conocidas. Astoreca y col. (2011) describieron la presencia de *A. flavus* en el 48 % de las muestras de alimentos balanceados estudiados, siendo el 62 % de los aislados capaces de producir aflatoxinas y el 80 % ácido ciclopiazónico. También se ha informado una frecuencia alarmantemente alta de *A. niger* var. *niger* capaz de producir ocratoxinas en alimentos para pollos en Argentina (Magnoli y col., 2005).

La presencia de estos hongos representa un riesgo potencial para la salud humana y animal, ya que variaciones en las condiciones medioambientales durante la producción, almacenamiento o distribución del alimento pueden desencadenar el desarrollo fúngico y/o la producción de toxinas.

Las micotoxinas causan importantes pérdidas económicas en la industria avícola reduciendo la tasa de crecimiento, los porcentajes de nacimiento, la eficiencia alimentaria y la inmunidad contra enfermedades (Rawal y col., 2010). Se han reportado pérdidas de \$932 millones debidas a la contaminación por micotoxinas y pérdidas adicionales de \$466 millones en esfuerzos por reducir la contaminación (CAST, 2003). El problema de las toxinas fúngicas no sólo incide en la economía de la producción avícola, si no que residuos de las toxinas consumidas por animales pueden aparecer en los productos derivados de los mismos destinados al consumo humano (Dersjant-Li y col., 2003).

Los hongos y toxinas en alimentos de pollos pueden ser reducidos en distintos puntos de control desde la materia prima al alimento elaborado. Actualmente el control fúngico en

alimentos se lleva a cabo por la adición de fungicidas como ácido propiónico, propionato de amonio, ácido sórbico y su sal potásica y ácido fórmico y sus sales cálcica y sódica (Gimeo y Martins, 2011).

Es de interés la búsqueda de métodos de control alternativos. Las bacterias ácido lácticas son capaces de producir una amplia variedad de sustancias antifúngicas que juegan un importante rol en su capacidad de actuar como conservantes, tales como ácido láctico, ácido acético, ácido fenil láctico, ácido cáprico, diacetilo, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, ácidos grasos 3-hidroxilados, reuterina y compuestos de naturaleza proteica (Schünurer y Magnusson, 2005).

Se ha propuesto la aplicación de BAL y metabolitos producidos por las mismas para la bioconservación de vegetales frescos, panificados, cárneos y lácteos (Garrote y col., 2010). Sin embargo existen pocos estudios sobre su aplicación para prevenir la contaminación fúngica de alimentos para animales.

En este capítulo se analiza la posibilidad de aplicar suero fermentado utilizando distintos starters como aditivo para prevenir el crecimiento fúngico en alimentos balanceados para pollos.

## OBJETIVOS

Analizar la potencialidad del suero fermentado como aditivo para prevenir el riesgo de contaminación fúngica de alimento balanceado para pollos, así como para constituir un vehículo de inclusión de microorganismos de kefir viables con potencialidad probiótica a la dieta de estos animales.

### Objetivos particulares

- Estudiar el efecto de suero fermentado con gránulos de kefir, las cepas aisladas de kefir *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348, *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327, *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 y un cultivo mixto conteniendo las 3 cepas antes mencionadas, sobre la inhibición de la germinación conidial de hongos contaminantes de piensos para aves y evaluar la implicancia de los ácidos orgánicos en el efecto inhibitorio.
- Evaluar la supervivencia de bacterias ácido lácticas y levaduras en el alimento balanceado para pollos adicionado con suero fermentado con gránulos de kefir y analizar el efecto de la adición en la prevención de la contaminación fúngica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Hongos

Se emplearon *Aspergillus flavus* AFUNL5 cedido por la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires, y *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 donado por la Universidad Nacional de Quilmes, *Fusarium graminearum* concedido por Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (Conicet-UNLP) y *Penicillium* sp. donado por la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Asimismo se emplearon *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma longibrachiatum* y *Rhizopus* sp. aislados a partir de alimento para pollos Nutrisur® especificado para pollos de 0 a 28 días. Estos hongos se seleccionaron por ser los que crecieron con mayor frecuencia en siembras realizadas a partir del alimento en medio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Los mismos se determinaron según Pitt y Hocking (2009). Los resultados obtenidos fueron confirmados mediante secuenciación de los espaciadores intergénicos ITS1 e ITS2 y comparación con la base de datos Genbank. Los hongos se conservaron en agar-agua (ver Apéndice) a 4 °C hasta su utilización.

### 2. Preparación de la solución de esporas

Los hongos se cultivaron durante 7 días en tubos de agar papa dextrosa (Britania S.A., Argentina) inclinado a 30 °C. En el caso de *Fusarium graminearum* la incubación se realizó durante 8 a 12 días en ciclos alternados de 12 h de luz blanca y 12 h de luz UV para favorecer la esporulación.

Al cumplirse el tiempo de incubación se adicionaron 10 ml de solución de esporos (ver Apéndice) a cada tubo y las esporas se despegaron mediante raspado de la superficie del medio con un ansa en anillo. El número de esporas se determinó por recuento empleando una cámara de Neubauer. Se realizaron las diluciones necesarias para obtener la concentración de esporas deseada para cada experimento.



### 3. Inhibición de la germinación conidial por sobrenadantes de suero fermentado

El porcentaje de reducción de la germinación conidial (%RG) se determinó mediante el método descrito por Lavermicocca y col. (2003). Se sembraron 190  $\mu\text{l}$  de los sobrenadantes a evaluar en microplacas estériles de 96 fosas (Corning, NY, USA). A cada fosa se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de una suspensión conteniendo  $10^4$  conidios/ml. Las placas se incubaron durante 48 h a 30 °C y luego se midió a densidad óptica a 580 nm ( $\text{DO}_{580}$ ) en un lector de microplacas (ELISA Plate Reader SLT Rainbow Reader, Wien, Austria). El porcentaje de reducción de la germinación se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\%RG = [(\text{DO}_{580} \text{ control positivo} - \text{DO}_{580} \text{ tratamiento}) / \text{DO}_{580} \text{ control positivo}] \times 100$$

Los controles positivos se realizaron sembrando la suspensión de conidios en sobrenadante de suero sin fermentar. Asimismo se incluyeron en el análisis controles de esterilidad de los sobrenadantes.

## 4. Adición de suero fermentado al alimento

### 4.1 Preparación del alimento adicionado

Se fermentó suero con gránulos de kefir al 10 % p/v de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo 1 (Materiales y métodos, sección 2). El mismo se adicionó a alimento para pollos de 0 a 28 días marca Nutrisur® (Argentina) en proporción 50 ml de producto fermentado cada 50 g de alimento. Luego el alimento fue secado en una estufa de convección a 50 °C hasta que su humedad fue tal que la actividad acuosa ( $A_w$ ) medida a 20 °C fue  $0.5 \pm 0.05$  (AquaLab Serie 3 TE, USA).

Empleando la misma metodología se adicionó al alimento suero acidificado con ácido clorhídrico a pH 3.7 y suero acidificado con ácidos orgánicos en la concentración presente en el suero fermentado (0.86 % de ácido láctico y 0.08 % de ácido acético). Como control se utilizó alimento humedecido con agua y secado en estufa bajo las mismas condiciones.

Se calculó la composición química del alimento adicionado. Se consideró para ello, la composición del alimento balanceado declarada por el proveedor y la determinada en el

presente estudio para suero fermentado con gránulos de kefir (ver Capítulo 1, Resultados y discusión, sección 2.2, Tabla 1.11, suero bovino en polvo).

#### **4.2 Supervivencia del probiótico en el alimento**

Para evaluar la supervivencia de los probióticos (BAL y levaduras) en el alimento se realizaron recuentos de microorganismos viables en placa los días 0, 15 y 30 de almacenamiento a 20 °C. Se tomaron muestras de 10 g de pienso adicionado con suero fermentado, se colocaron en 90 ml de peptona 0.1 % con glicerol 20 % y se homogeneizaron en un Stomacher (Seward Medical, modelo 400, U.K.). Luego se realizaron diluciones en peptona 0.1 %, se sembraron en medios YGC para levaduras y MRS para bacterias ácido lácticas y las colonias se contaron luego de 48 h de incubación a 30 °C.

#### **4.3 Resistencia del alimento a la contaminación fúngica**

Para analizar la resistencia de los alimentos a la contaminación por hongos se adaptó el método descrito por Gerez y col. (2009) desarrollado para evaluar la vida útil de panes elaborados con bacterias ácido lácticas. El alimento control y el adicionado con suero fermentado, con suero con ácido clorhídrico y con suero con ácidos orgánicos, fue fraccionado de a 10 g en cajas de petri estériles. Luego sobre cada caja se pulverizó 1ml de una suspensión de esporos conteniendo  $10^4$  conidios/ml. Las placas se incubaron a 20 °C y se revisaron diariamente determinándose los días transcurridos hasta hacerse visible el crecimiento del hongo. Se realizaron 3 ensayos para los 8 hongos descritos en el apartado 2.4, en cada ensayo cada uno de los 4 tratamientos se evaluó por triplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Inhibición de la germinación conidial por sobrenadantes de suero fermentado

A fin de analizar la posibilidad de aplicar distintos sueros fermentados para el control de la contaminación por hongos de alimento para aves, se evaluó inicialmente el efecto antifúngico *in vitro* de los sobrenadantes de estos productos.

Se analizó la capacidad antifúngica de suero fermentado con gránulos de kefir; con las cepas *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348, *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327 y *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154; y con el cultivo mixto de estas 3 cepas, todas ellas aisladas de kefir.

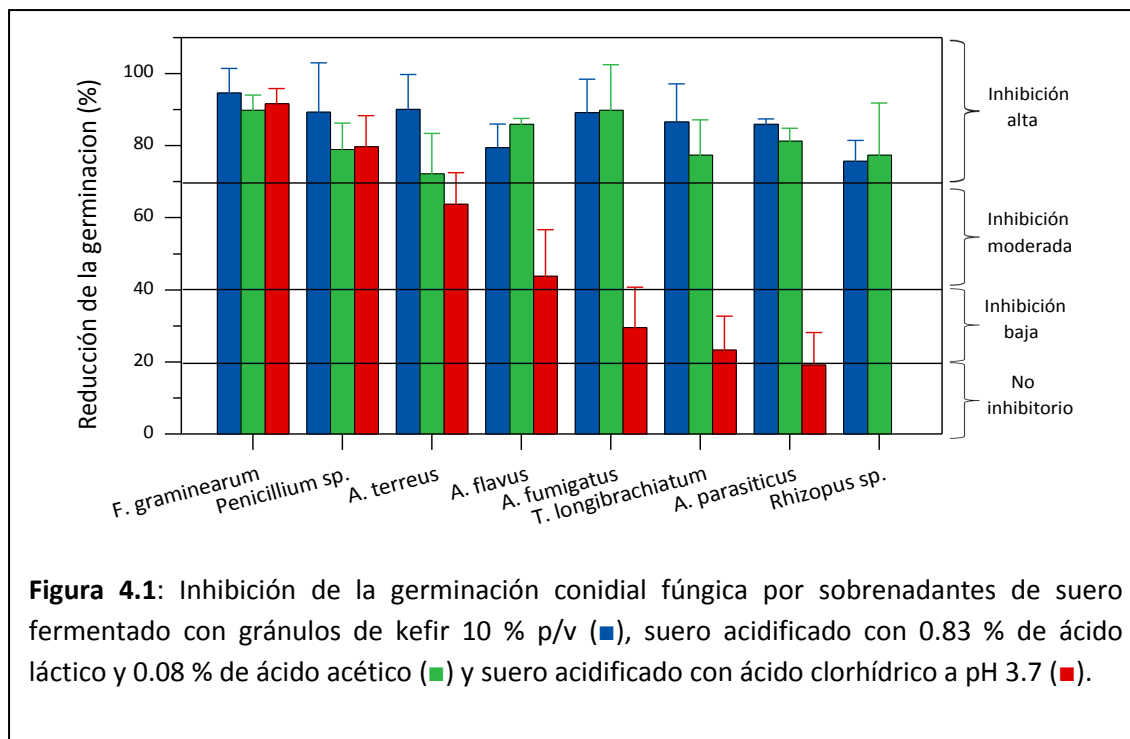
Se emplearon *Aspergillus flavus* AFUNL5, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, *Fusarium graminearum*, *Penicillium* sp., *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma longibrachiatum* y *Rhizopus* sp., que han sido descritos previamente como contaminantes frecuentes de alimentos para aves (Dalcero y col., 1998; Krnjaja y col., 2010; Saleemi y col., 2010; Magnoli y col., 2005; Azarakhsh y col., 2011). Algunas de las especies fúngicas empleadas en el presente estudio son capaces de producir micotoxinas. Entre las más importantes se pueden citar las aflatoxinas producidas por algunas cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*, el ácido ciclopiazónico por cepas de *A. flavus*, la gliotoxina por *A. fumigatus*, ocratoxinas producidas por algunas especies de *Penicillium* sp. y tricotecenos por *F. graminearum* (Gimeo y Martins, 2011). Asimismo hongos del género *Aspergillus* son causantes de aspergilosis pulmonar aguda o crónica en aves, que presenta distintos grados de severidad de acuerdo al estado fisiológico del individuo siendo *A. fumigatus* el principal agente causante de esta enfermedad (Beernaert, 2010).

El efecto antifúngico del suero fermentado sobre los hongos antes mencionados se midió mediante la evaluación de la inhibición de la germinación conidial de acuerdo a lo descrito por Lavermicocca y col. (2003). La germinación conidial es un paso crucial en el desarrollo de los hongos empleándose frecuentemente como indicador del poder antifúngico de distintos compuestos (Araujo y Rodrigues, 2004).

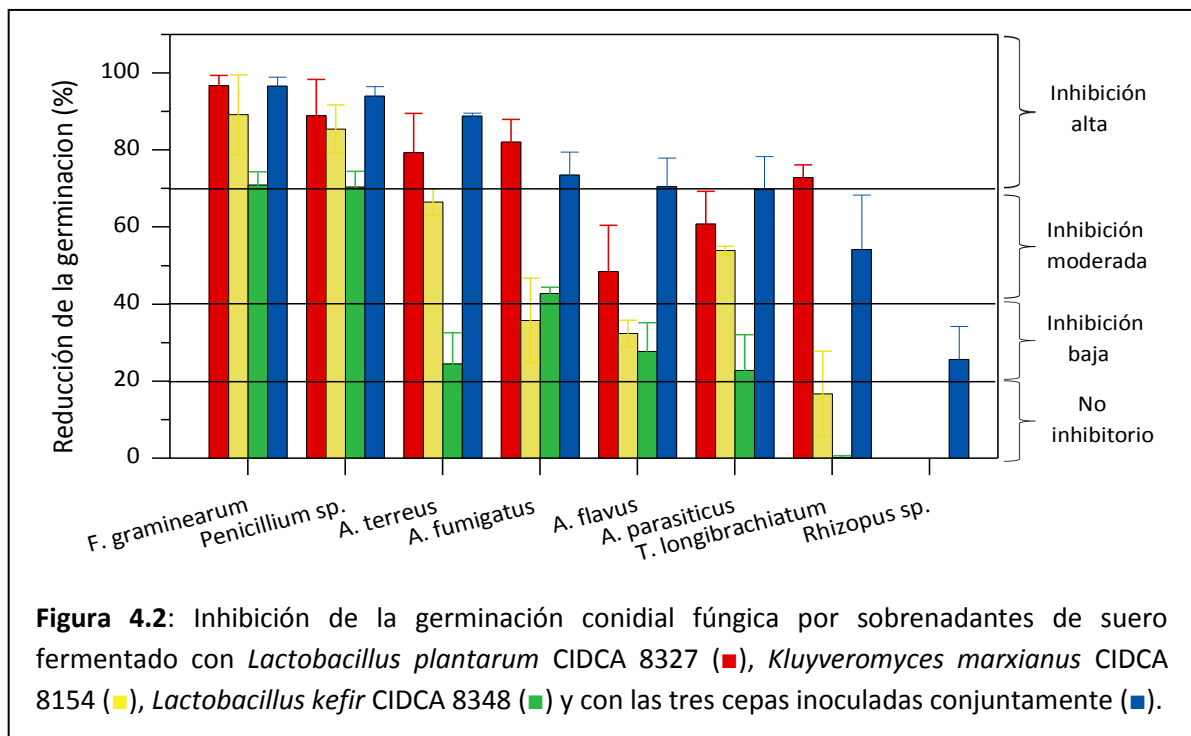
Se evaluó el efecto inhibitorio de la germinación conidial de **suero fermentado con gránulos de kefir** debido a que, entre otros sueros fermentados caracterizados en este trabajo, fue el que presentó mayor efecto inhibitorio sobre enteropatógenos (Capítulo 2, resultados y

discusión, sección 2.1). De acuerdo a los resultados obtenidos en el Capítulo 2 el poder antibacteriano de este producto se relaciona fundamentalmente con su contenido de ácidos orgánicos. A fin de analizar si estos metabolitos están también implicados en la capacidad antifúngica se incluyó en el análisis suero adicionado con ácido láctico y acético a la misma concentración y al mismo pH en que se encuentran en el suero fermentado con gránulos de kefir. Asimismo se evaluó la incidencia del bajo pH en la inhibición incluyéndose un tratamiento con suero acidificado con HCl hasta pH 3.7 correspondiente al del suero fermentado con gránulos de kefir. La inhibición se consideró alta cuando el porcentaje de reducción de la germinación (%RG) presentó valores mayores al 70 %, moderada cuando estuvo entre 40 y 70 %, baja entre 20 y 40 % e inexistente cuando fue menor a 20 % (Gerez y col., 2009).

El suero fermentado con gránulos de kefir y el suero acidificado con ácidos orgánicos presentaron porcentajes de inhibición de la germinación altos y similares sobre las 8 especies fúngicas evaluadas (Figura 4.1). El suero acidificado con ácido clorhídrico a pH 3.7 presentó capacidad inhibitoria alta sólo sobre *Fusarium graminearum* y *Penicillium sp.*, no resultó inhibitorio para *Rhizopus sp.* y para el resto de las especies sólo redujo la germinación conidial en porcentajes moderados y bajos.



Se estudió además el efecto antifúngico de **suero fermentado con las cepas aisladas de kefir** (*L. kefir* CIDCA 8348, *L. plantarum* CIDCA 8327 y *K. marxianus* CIDCA 8154) en forma individual o conjunta, y cuyos sobrenadantes presentan distinto pH y composición de ácidos orgánicos. El suero fermentado con *L. kefir* CIDCA 8348 presenta pH 5.7 y baja concentración de ácido láctico (0.11 %) y de ácido acético (0.04 %). El suero fermentado con *K. marxianus* CIDCA 8154 presenta similar pH (~ 5) que el obtenido con *L. plantarum* CIDCA 8327, sin embargo a diferencia de este último, posee ácido málico y otros 2 ácidos que no pudieron ser identificados y presenta menor concentración de ácido láctico y mayor concentración de ácido acético. El suero fermentado con las 3 cepas en cultivo mixto presenta pH 4.5 y mayor concentración de ácidos láctico y acético que los sueros fermentados con cepas individuales (Capítulo 1, Resultados y discusión, sección 3.2.2). Los sueros fermentados con cepas aisladas de kefir presentaron distinta capacidad de inhibir la germinación conidial. Puede notarse que, en general, el efecto antifúngico fue mayor para sobrenadantes de suero fermentado con *L. plantarum* CIDCA 8327 y con las 3 cepas simultáneamente. El suero fermentado con *K. marxianus* CIDCA 8154 presentó actividad inhibitoria intermedia y el obtenido empleando *L. kefir* CIDCA 8348 baja (Figura 4.2).



Se observó que distintas especies fúngicas presentaron diferente sensibilidad al mismo producto fermentado. Por ejemplo, puede notarse en el gráfico que el suero fermentado con *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 inhibió a distintos hongos en porcentajes que van desde 84 % para *F. graminearum* a 0 % para *Rhizopus* sp.

En general *Fusarium graminearum* y *Penicillium* sp. fueron los hongos más sensibles y *Rhizopus* sp. el más resistente a todos los productos. Sin embargo otras especies mostraron más sensibilidad a un producto que a otro. Por ejemplo, *A. flavus* y *A. fumigatus* fueron inhibidas de manera similar por sobrenadantes de suero fermentado con *K. marxianus* y *L. kefir*; mientras que *A. terreus*, *A. parasiticus* y *T. longibrachiatum* fueron notoriamente más inhibidas por suero fermentado con *K. marxianus* que con *L. kefir*. Esto indicaría que estas últimas 3 especies son particularmente sensibles a algún metabolito presente en el suero fermentado con *K. marxianus* al que *A. flavus* y *A. fumigatus* son resistentes.

Del análisis global de estos resultados puede destacarse que el suero fermentado con gránulos de kefir, con cepas aisladas de kefir combinadas y con *L. plantarum* CIDCA 8327 presentan una notable capacidad de inhibir la germinación conidial de hongos filamentosos. Estos resultados son relevantes dado que hasta el momento el conocimiento de la inhibición de hongos filamentosos por kefir y cepas aisladas del mismo es escaso. Cevikbas y col. (1994) describieron que el kefir presentaba actividad antifúngica contra varios géneros de levaduras y los hongos filamentosos *Microsporum* sp. y *Trichophyton* sp. En una publicación reciente se describe la capacidad del kefir de inhibir el crecimiento de *Fusarium graminearum* y la germinación y producción de aflatoxinas de *Aspergillus flavus* (Ismail y col., 2011). Asimismo se ha descrito que *Lactobacillus paracasei* K VI aislada de kefir inhibe el crecimiento de *Fusarium graminearum* y es capaz de capturar la toxina desoxinivalenol producida por este hongo (Franco y col., 2011).

El efecto inhibitorio obtenido para suero acidificado artificialmente con ácido láctico y acético, indica que estos ácidos están en gran medida implicados en el efecto antifúngico del suero fermentado con gránulos de kefir. El ácido acético es efectivo en la prevención del crecimiento de numerosos hongos filamentosos mientras que el ácido láctico tiene un

efecto antifúngico limitado (Conková y col., 1993; De Reu y col., 1995; Araujo y Rodrigues, 2004; Pundir y Jain, 2010). Se ha descrito que la concentración inhibitoria mínima de ácido láctico es aproximadamente 10 veces superior a la de acético para hongos filamentosos (Gerez y col., 2009; León Peláez y col., 2012). Sin embargo, se ha demostrado que estos dos ácidos presentan efecto sinérgico, potenciándose su actividad antifúngica cuando se encuentran combinados (Cabo y col., 2002; León Peláez y col., 2012).

La variabilidad en la sensibilidad de distintos hongos al mismo producto fermentado con cepas aisladas de kefir, no invalida la posibilidad de que el efecto inhibitorio se deba a la presencia de ácidos orgánicos débiles. Según la teoría clásica acerca del mecanismo de acción de estos compuestos la sensibilidad debería ser similar para distintas especies dado que la inhibición es inespecífica. De acuerdo a esta teoría, a bajo pH los ácidos débiles se hallan no disociados y pueden atravesar la membrana celular fúngica por difusión. Una vez en el interior de las células los ácidos se disocian y no pueden retornar al exterior, permaneciendo dentro de las células, acidificando el citoplasma y alterando así diversas funciones celulares (Krebs y col., 1983). Sin embargo esta teoría se halla en revisión en el caso de hongos dado que existen evidencias que prueban que los ácidos orgánicos no afectan a los hongos esporulados de acuerdo al mecanismo de acción clásico (Stratford y Anslow, 1996; Plumridge y col., 2004). Según la teoría clásica el ácido sórbico y el acético que presentan el mismo  $pK_a$  deberían producir la misma acidificación citoplasmática, sin embargo el sórbico es substancialmente más tóxico que el acético. Más aún, ciertos hongos esporulados han mostrado notablemente mayor resistencia a algunos ácidos orgánicos que a otros. La diferencia en la sensibilidad a los ácidos orgánicos entre especies fúngicas se ha explicado por distintos mecanismos de acción y de resistencia a los mismos. A modo de ejemplo, se ha descrito que la inhibición de *Aspergillus niger* por ácido sórbico ocurre por un daño en la membrana celular (Stratford y col., 2009). También se ha sugerido que este ácido interfiere con el transporte de nutrientes, al menos de uridina, al interior de los conidios de *Aspergillus niger* posiblemente interactuando con transportadores de membrana (Melin y col., 2008). Como ejemplo de mecanismo de resistencia puede mencionarse que sobre *Saccharomyces* sp. y *Candida albicans* los ácidos débiles activan

factores de transcripción War1 que inducen el bombeo activo de aniones fuera de las células. También se han descrito enzimas que degradan los ácidos orgánicos, cambios en la superficie celular que minimizan la difusión de los ácidos al interior de las células y la expresión de porinas que facilitan la difusión al exterior de ácidos no disociados (Piper y col., 2011).

Se puede decir por lo tanto, que las diferencias observadas entre los productos fermentados en cuanto a su capacidad de inhibir distintos hongos podrían deberse a su distinta composición cualitativa y cuantitativa de ácidos orgánicos así como a mecanismos de acción y resistencia particulares de cada especie fúngica. Sin embargo no puede descartarse la presencia de otros metabolitos antifúngicos además de los ácidos orgánicos. Es destacable el alto poder antifúngico hallado para el suero fermentado con *L. plantarum* CIDCA 8327. Este producto presenta pH 5 y una concentración de ácido láctico de 0.23 % y de acético de 0.04 %. Su capacidad inhibitoria fue similar, excepto sobre *A. flavus* y *Rhizopus* sp., a la del suero fermentado con las 3 cepas conjuntamente que presenta menor pH (4.5) y mayor concentración de ácido láctico (0.46 %) y acético (0.19 %). Esto sugiere la producción de otros metabolitos antifúngicos, además de ácidos orgánicos, por *L. plantarum* CIDCA 8327 en suero. Distintas cepas de esta especie son capaces de producir sustancias antifúngicas de bajo peso molecular tales como ácido fenil láctico e hidroxifenil láctico (Laverimocca y col. 2000; Ström y col., 2002), dipéptidos cíclicos tales como ciclo(Gly-L-Leu), ciclo(L-Phe-L-Pro) y ciclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) (Ström y col., 2002), ácido benzoico, metilhidantoina y mevalonolactona (Niku-Paavola y col., 1999). Debido a su capacidad para sintetizar compuestos fungicidas se ha sugerido la aplicación de *L. plantarum* como cultivo iniciador en masas para aumentar la vida útil de productos panificados (Laverimocca y col., 2000; Dal Bello y col., 2007; Gerez y col., 2009; Coda y col., 2011) y para bio-preservar vegetales frescos (Sathe y col., 2007). El crecimiento de *L. plantarum* en suero, sumado a la producción de compuestos antifúngicos y antibacterianos en este sustrato, demostrados a lo largo del presente trabajo, sugieren la potencialidad de esta especie para su aplicación en el desarrollo de ingredientes bio-preservantes de bajo costo elaborados a base de suero.



## 2. Adición de suero fermentado al alimento para su conservación

Considerando que el mayor efecto antifúngico *in vitro* fue demostrado para suero fermentado con gránulos de kefir, este producto fue seleccionado para evaluar su adición a alimento balanceado para aves, con la finalidad de obtener un producto que contenga microorganismos probióticos viables y sea además resistente a la contaminación por hongos.

El suero fermentado con gránulos de kefir fue mezclado con el alimento balanceado en proporción 1 L por cada 1 kg de alimento. Luego fue secado en una estufa a convección a 50 °C hasta alcanzar una humedad tal que la actividad acuosa ( $A_w$ ), medida a 20 °C, fuera semejante a la  $A_w$  del alimento sin adicionar ( $0.5 \pm 0.05$ ). Mediante la misma metodología y a modo de controles, se prepararon alimentos adicionados de suero con igual contenido de ácidos orgánicos que el producto fermentado y suero acidificado con HCl.

La adición de suero fermentado al alimento no modificó su contenido de proteínas, minerales totales, ni fósforo aunque sí presentó mayor contenido de calcio (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1:** Composición química calculada para el alimento balanceado adicionado.

Composición Centesimal	Alimento balanceado	Suero fermentado	Alimento adicionado
Tenor mín. de proteína bruta	22.80 %	0.87 %	21.50 %
Tenor máx. de minerales totales	6 %	0.71 %	6.10 %
Tenor de calcio mín-máx	0.9-1.1 %	0.4-0.6 %	1.3-1.7 %
Tenor de fósforo mín-máx	0.45-0.55 %	< 0,01 %	0.45-0.55 %

Por otro lado sin variar el contenido de proteínas totales, aportaría aminoácidos tales como lisina, metionina, triptófano y otros azufrados que se encuentran en suero (Smithers, 2008) y son relevantes en la alimentación de aves (Baker y Han, 1994). Asimismo se estarían agregando al alimento 3.5 g% de lactosa. Se ha descrito que la adición de lactosa a la dieta de pollos causa un descenso del pH y un aumento de la concentración de ácidos orgánicos en los ciegos protegiéndolos contra la invasión de *Salmonella* Enteritidis (Tellez y col., 1993;

Corrier y col., 1997) y reduciendo los signos de la enfermedad causada por *Clostridium perfringens* (McReynolds y col., 2007).

### 2.1 Supervivencia de bacterias ácido lácticas y levaduras en el alimento balanceado

Se evaluó la resistencia de los microorganismos al proceso de incorporación al alimento y su supervivencia durante el almacenamiento. La concentración de las BAL y levaduras en el pienso se analizó mediante recuentos realizados inmediatamente luego del secado (día 0) y después de 15 y 30 días de almacenamiento a 20 °C (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2:** Concentración de bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras en el alimento adicionado con suero fermentado con gránulos de kefir 10 % p/v durante su almacenamiento a 20 °C.

Días de almacenamiento	BAL (UFC/g)	Levaduras (UFC/g)
0	$5.9 \pm 2.3 \times 10^6$	$5.0 \pm 1.9 \times 10^5$
15	$1.1 \pm 0.9 \times 10^5$	$6.8 \pm 1.4 \times 10^4$
30	$1.0 \pm 0.9 \times 10^5$	$6.0 \pm 2.5 \times 10^4$

Los valores corresponden al promedio  $\pm$  el desvío estándar de 4 ensayos independientes.

El suero fermentado con gránulos de kefir posee una concentración de BAL de  $1 \times 10^7$  UFC/ml y de levaduras de  $4 \times 10^6$  UFC/ml (Capítulo 1, Resultados y discusión, sección 1.2). Al adicionar este producto, si no hubiera pérdida de viabilidad, el pienso debería contener una concentración de BAL de  $9.1 \times 10^6$  UFC/g y de levaduras de  $3.6 \times 10^6$  UFC/g. Respecto a estos valores, la supervivencia al proceso de secado realizado a 50 °C por aproximadamente 120 min, fue del 64 % para las BAL y del 13 % para las levaduras adicionadas (Tabla 4.2).

En concordancia con estos resultados se ha descrito mayor resistencia al tratamiento térmico para BAL que para levaduras aisladas de kefir (Golowczyc y col., 2010). Golowczyc (2008) describió que luego del tratamiento térmico a 55 °C durante 50 min el número de microorganismos viables de *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 desciende 2 órdenes logarítmicos y el de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 desciende 5 órdenes logarítmicos,

mientras que *Saccharomyces lipolytica* CIDCA 812 expuesta durante 70 min a 50 °C disminuye 6 órdenes logarítmicos. En el presente estudio se obtuvo una reducción de la concentración de microorganismos viables inferior a 1 orden logarítmico tanto de BAL como de levaduras durante el tratamiento a 50 °C por 120 min, hallándose mayor termotolerancia en este sistema que la descrita previamente para cepas aisladas de kefir en un entorno diferente.

La resistencia al tratamiento térmico de los microorganismos se encuentra influenciada por el medio y las condiciones de cultivo así como por la exposición previa a otros factores de stress (Annous y col., 1999; Desmond y col., 2001; Piper, 1993). Se ha descrito que la escasez de nutrientes, la presencia de ácidos orgánicos y la exposición a pH ácido pueden inducir termotolerancia en levaduras (Cotte y col., 1991; Carmelo y col., 1998) y en bacterias ácido lácticas (Annous y col., 1999; Zotta y col., 2008; Fernández y col., 2009). Es posible, por lo tanto, que el crecimiento de los microorganismos de kefir en suero que presenta deficiencia de nitrógeno, o el alto contenido de ácidos orgánicos y el bajo pH del suero fermentado, representen factores de stress que induzcan resistencia al tratamiento térmico.

Por otro lado los microorganismos de kefir que fueron tratados térmicamente se encontraron embebidos en la matriz sólida del pienso. Se ha descrito que variables como el tamaño y distribución de tamaño de los granos del alimento, así como la actividad acuosa y el pH pueden afectar la eficiencia de inactivación térmica de microorganismos contenidos en matrices de alimentos balanceados (Mackey y col., 2006; Okelo y col., 2006). También la presencia de suero podría interferir en la termotolerancia. Se ha descrito que la inmovilización de *Lactobacillus rhamnosus* en una matriz de proteínas aisladas de suero desnaturalizadas o hidrolizadas lo protegen contra el stress térmico (Doherty y col., 2010).

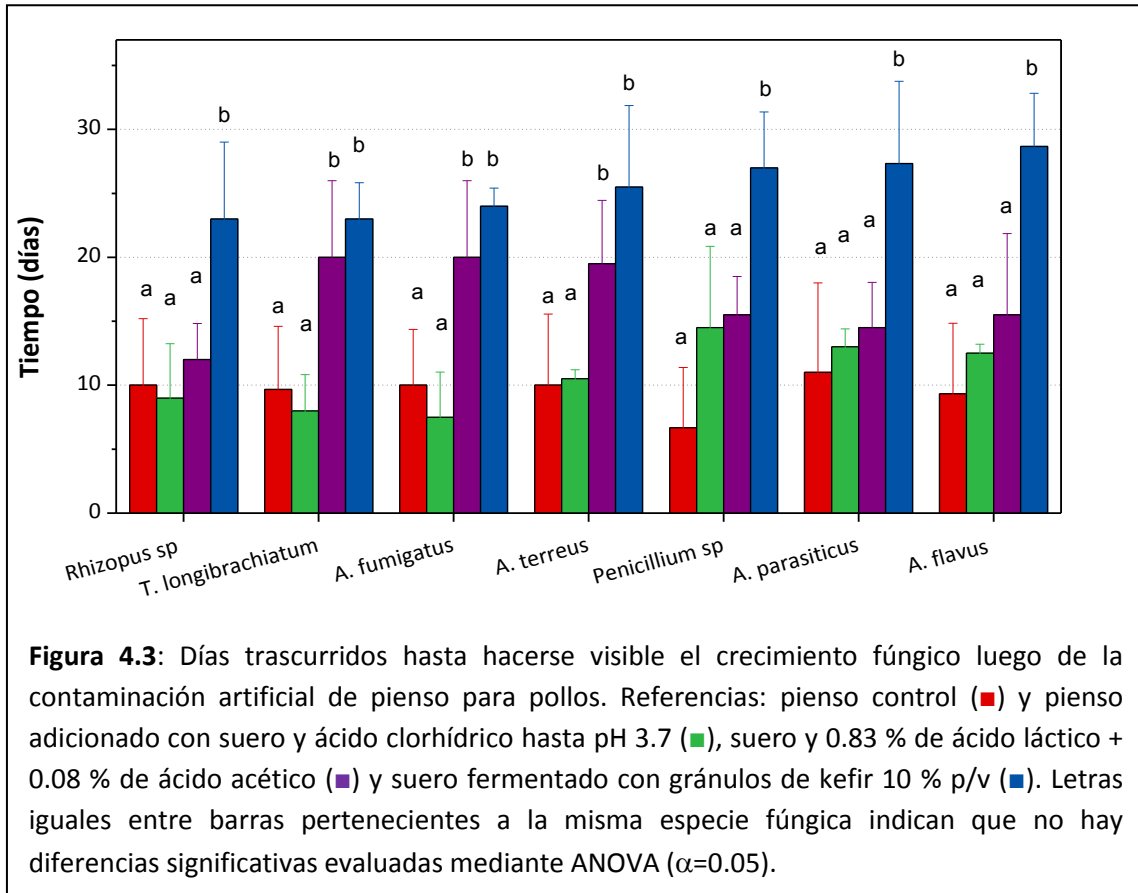
Los microorganismos de kefir adicionados fueron además notoriamente resistentes al almacenamiento a 20 °C, se observó una pérdida de viabilidad de 1 orden logarítmico durante los primeros 15 días de almacenamiento y luego la concentración se mantuvo constante hasta los 30 días de almacenamiento (Tabla 4.2).

Luego del almacenamiento el producto contuvo  $1 \times 10^8$  UFC/kg de BAL y  $6 \times 10^7$  UFC/kg de levaduras. La dosis efectiva de probióticos incluidos en alimento balanceado de aves reportadas por otros autores se halla generalmente entre  $10^8$  y  $10^9$  UFC/kg de alimento (Apata, 2008; Kim y col, 2011; Mountzouris y col., 2010) aunque varía según el producto.

En los ensayos *in vivo* realizados en este trabajo (Capítulo 3, parte B), se obtuvo una mayor protección contra la colonización intestinal por *Salmonella* al administrar suero fermentado en agua de bebida en una concentración de  $10^8$ -  $10^9$  UFC/pollo por día. En base al consumo de alimento registrado durante los ensayos *in vivo*, esta dosis es mayor que la que se lograría por administración del alimento adicionado de suero fermentado ( $1$ - $2 \times 10^7$  UFC/pollo por día). Sin embargo la efectividad puede variar según la forma de administración. Los ensayos *in vivo* realizados en este trabajo indicaron que el suero fermentado es más efectivo en el control de la infección con *Salmonella* al ser administrado *ad libitum* en agua de bebida que en una dosis diaria controlada. De manera similar que la administración en agua de bebida, la inclusión de probióticos en el alimento tendría la ventaja de que el consumo es constante y se incrementa con la edad del individuo. Por lo tanto la efectividad del suero fermentado con gránulos de kefir bajo esta forma de administración así como la dosis requerida para conseguir el efecto deseado debe ser evaluada en ensayos futuros.

## **2.2 Resistencia a la contaminación fúngica**

La resistencia a la contaminación fúngica se analizó contaminando artificialmente el pienso por pulverización de suspensiones de conidios fúngicos. Luego el alimento contaminado se almacenó a 20 °C y se determinó la cantidad de días transcurridos hasta hacerse visible el crecimiento del hongo.



Para este ensayo se emplearon los hongos: *A. flavus* AFUNL5, *A. parasiticus* NRRL 2999; *Penicillium* sp., *T. longibrachiatum*, *A. fumigatus*, *Rhizopus* sp. y *A. terreus*, las últimas 4 especies aisladas a partir de alimento balanceado para pollos.

Todos los piensos adicionados con suero fermentado con gránulos de kefir presentaron una notoria resistencia a la contaminación fúngica (Figura 4.3).

Puede notarse que en los alimentos sin tratar hubo crecimiento visible de los hongos luego de 7 a 11 días de almacenamiento. Cuando el alimento fue adicionado con suero acidificado con ácido clorhídrico a pH 3.7 no se observó un retardo significativo ( $\alpha=0.05$ ) en la aparición del crecimiento.

El agregado de suero adicionado con ácidos orgánicos prolongó significativamente la aparición visible de crecimiento fúngico sólo para *T. longibrachiatum*, *A. terreus* y *A. fumigatus*. Para estas 3 especies el tiempo promedio de almacenamiento sin crecimiento fúngico visible se duplicó respecto al control.

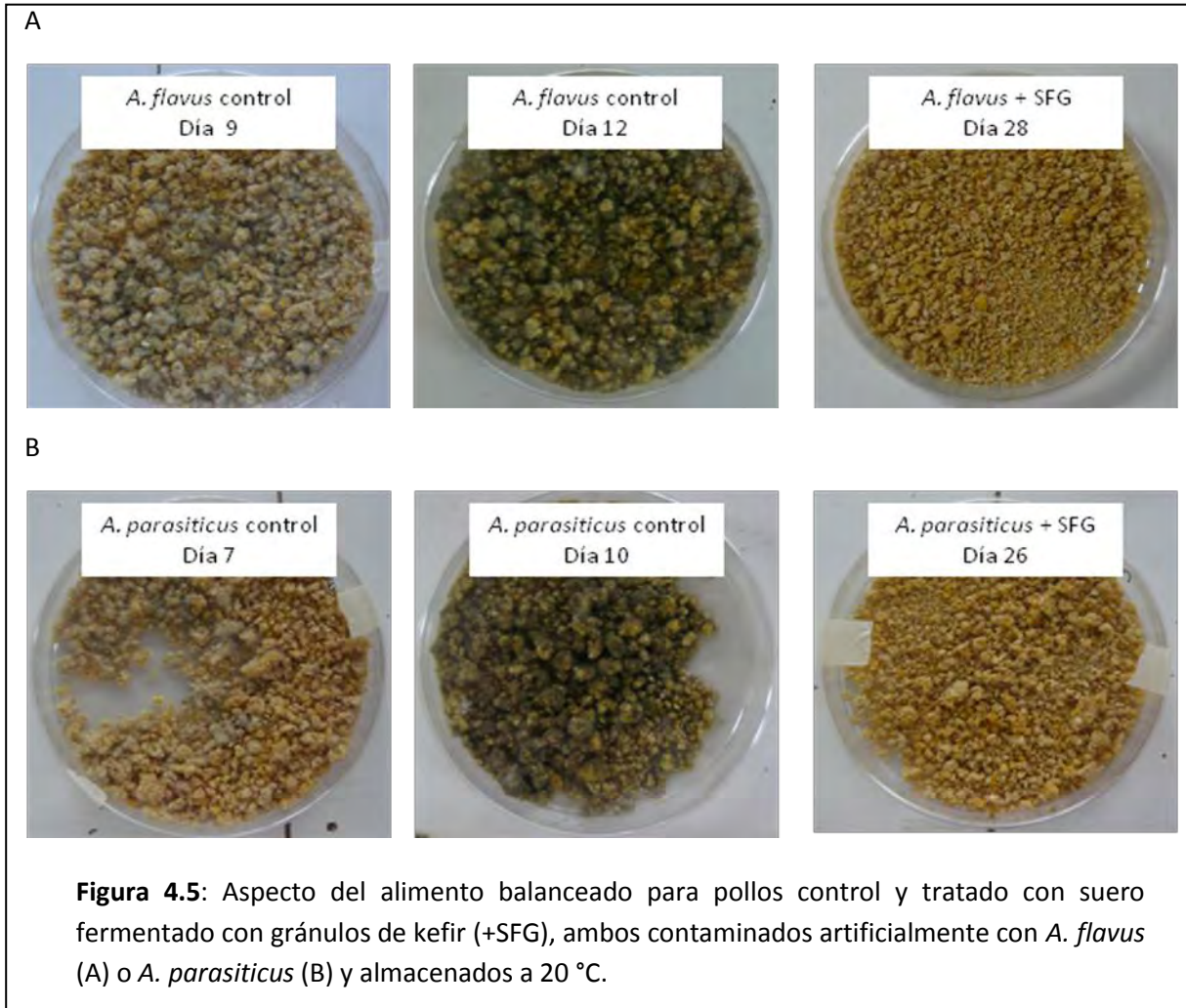
En la Figura 4.4 se muestra a modo de ejemplo una fotografía de la apariencia del alimento contaminado con *Penicillium* sp. luego de 20 días de almacenamiento.



**Figura 4.4:** Alimento balanceado para pollos sin tratar (control) y adicionado con suero acidificado y ácido clorhídrico (suero + HCl), suero adicionado con ácidos orgánicos (Suero + AO) y suero fermentado con gránulos de kefir, contaminado artificialmente con *Penicillium* sp. y almacenado durante 20 días a 20 °C.

Puede observarse un importante desarrollo fúngico en el alimento control, el comienzo del desarrollo del hongo en el alimento adicionado de ácido clorhídrico o ácidos orgánicos y ausencia de contaminación en el alimento adicionado con suero fermentado con gránulos de kefir.

Para las 7 especies evaluadas el tiempo de almacenamiento promedio sin presencia fúngica visible de los alimentos tratados con suero fermentado fue de 23 a 29 días, prolongándose de este modo, 2 a 4 veces la vida útil del alimento respecto al control. A modo de ejemplo se muestran fotografías del aspecto de los alimentos control y adicionados con suero fermentado contaminados con *A. flavus* y *A. parasiticus* luego de distintos tiempos de almacenamiento (Figura 4.5).



Todos los hongos, a excepción de *T. longibrachiatum*, *A. terreus* y *A. fumigatus*, resultaron más inhibidos por la adición de suero fermentado que de suero acidificado con ácidos orgánicos. Esto indicaría que los ácidos láctico y acético no son los únicos responsables de la inhibición. En los ensayos de inhibición de la germinación realizados con sobrenadantes *in vitro* (apartado 4.1) se obtuvo un efecto similar del suero fermentado respecto al acidificado con ácidos orgánicos. En este ensayo además de la germinación se evalúa el crecimiento ya que, para evidenciar macroscópicamente la presencia del hongo, debe haber desarrollo del micelio. Los resultados podrían indicar que el efecto inhibitorio del crecimiento fúngico del suero fermentado es mayor que el del suero adicionado con ácidos orgánicos. La diferencia también podría deberse a la producción *in situ* de metabolitos por los microorganismos de kefir que se hallan viables en el alimento.

Las BAL y sus metabolitos han sido evaluados como biopreservantes en distintos alimentos, tales como vegetales frescos, productos cárneos, panificados y lácteos (Garrote y col., 2010). Sin embargo su aplicación para la conservación de alimentos balanceados para animales no ha sido estudiada aún en profundidad. Murry y col. (2004) estudiaron la inhibición del crecimiento en un medio de cultivo sólido formulado con componentes de alimento balanceado y sugirieron que *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus plantarum* podrían ser útiles para controlar el crecimiento de enteropatógenos en pienso para aves. Asimismo, Heres y col., (2003) demostraron que la fermentación de alimento para aves con *Lactobacillus plantarum* previene su contaminación con enteropatógenos.

En el presente trabajo se demuestra que la adición de suero fermentado con gránulos de kefir a alimento balanceado para pollos es efectiva en el control de la contaminación fúngica, aportando además al alimento bacterias ácido lácticas y levaduras con potencialidad probiótica. Estos resultados abren perspectivas futuras acerca de la aplicación de este y otros productos similares en la bio-preservación de alimentos para animales.



## CONCLUSIONES

- El suero fermentado 24 h a 20 ° C con 10 % p/v de gránulos de kefir reduce de 75 a 100 % la germinación conidial de hongos contaminantes de pienso para aves: *Aspergillus flavus* AFUNL5, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, *Fusarium graminearum*, *Penicillium* sp., *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma longibrachiatum* y *Rhizopus* sp.
- El efecto antifúngico del suero fermentado con gránulos de kefir se asocia a su contenido de ácido láctico y ácido acético no disociados.
- La capacidad inhibitoria de los productos obtenidos por fermentación de suero con *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 o *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 varía de acuerdo a la especie fúngica evaluada. Aquellos obtenidos por fermentación con *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327 o con las tres cepas conjuntamente, reducen más del 70 % la germinación conidial de 5 y 6 de los 8 hongos evaluados respectivamente.
- El pienso para pollos adicionado con suero fermentado con gránulos de kefir contiene bacterias ácido lácticas ( $1 \times 10^8$  UFC/kg) y levaduras ( $6 \times 10^7$  UFC/kg) potencialmente probióticas viables aún luego de 30 días de almacenamiento y presenta alta resistencia a la contaminación por hongos deteriorantes.

## Conclusiones generales

---



Las crecientes restricciones en el uso de antibióticos como profilácticos y factores de crecimiento en la industria avícola debidas a la diseminación de genes de resistencia, han propiciado la búsqueda de alternativas para el control de microorganismos patógenos. Entre los métodos de control, el uso de probióticos está cobrando cada vez mayor importancia.

Atendiendo a la inquietud de desarrollar a bajo costo nuevos alimentos funcionales que contribuyan de manera natural al buen estado de salud de aves de corral y/o eviten contraer enfermedades, se planteó en el presente trabajo el aprovechamiento de un subproducto de la industria láctea como es el suero de quesería, para la obtención de un producto probiótico para aves empleando microorganismos de kefir.

Se demostró que los gránulos de kefir mantienen su integridad durante numerosos subcultivos en suero a 20 °C. Se analizó además la utilización de cultivos madre y cepas aisladas de kefir como *starters* alternativos interesantes para la producción industrial.

Los distintos sueros fermentados se caracterizaron química y microbiológicamente y se analizó su capacidad de inhibir *in vitro* cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* aisladas de pollos infectados o alimentos derivados, dada la relevancia de estos patógenos como causantes de enfermedades en aves de corral. Se determinó que distintos sueros fermentados con 10 % de gránulos de kefir presentan efecto bactericida, siendo su contenido de ácido láctico no dissociado el principal metabolito responsable de la inhibición. Asimismo, los sueros fermentados con *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327, *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 y *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 inhiben el crecimiento de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*, siendo este efecto mayor para el producto obtenido con estas cepas en cultivo mixto.

Utilizando el modelo de epitelio intestinal Caco-2/TC7 se demostró que la interacción de *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis con las bacterias ácido lácticas y levaduras del suero fermentado disminuye su asociación e invasión, y que la preincubación del patógeno en el sobrenadante de este producto afecta su capacidad invasiva. El suero fermentado con gránulos de kefir presenta mayor efecto inhibitorio y capacidad de proteger a enterocitos de la adhesión e invasión de *Salmonella* Enteritidis que el producto obtenido fermentando

suero con cepas aisladas de kefir, indicando la importancia de la diversidad microbiana en el efecto antagónico.

Finalmente se evaluó la administración de suero fermentado a pollos parrilleros determinándose que su consumo no afecta la humedad de las heces, la ingesta de alimento y agua ni los parámetros productivos de las aves, aunque sí se detecta una variación en la comunidad bacteriana, particularmente de *Lactobacillus* sp., del íleon. Pudo determinarse que el producto administrado *ad libitum* en el agua protege a los pollos contra la colonización de *Salmonella* Enteritidis ya que la concentración del patógeno en heces disminuye significativamente.

Por otra parte, se estudió la posibilidad de adicionar este producto a pienso para aves con la finalidad de utilizarlo como vehículo para introducir microorganismos de kefir con potencialidad probiótica y prevenir su contaminación con hongos deteriorantes y/o toxigénicos. En este sentido, se determinó que el alimento adicionado con suero fermentado presenta una notable resistencia a la contaminación fúngica y posee bacterias ácido lácticas y levaduras viables, aún luego de 30 días de almacenamiento, en concentraciones recomendadas para alimentos probióticos.

*De este modo, en el presente trabajo se obtuvieron distintos productos por fermentación de suero con microorganismos de kefir capaces de inhibir microorganismos patógenos, antagonizar la acción de Salmonella in vitro e in vivo y/o de actuar como bioconservantes.*

# Apéndice

---



## 1. Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo, excepto los casos indicados, se esterilizaron en autoclave a 120 °C, durante 15 minutos.

### *Caldo MRS (Difco, Detroit, USA).*

Peptona	10	g/L
Extracto de carne	10	g/L
Extracto de levadura	5	g/L
D(+) glucosa	20	g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	g/L
Tween 80	1	g/L
Citrato ácido de amonio	2	g/L
Acetato de sodio	5	g/L
MgSO <sub>4</sub>	0.1	g/L
MnSO <sub>4</sub>	0.05	g/L
pH = 6.5 ± 0.2		

### *Agar MRS*

Caldo MRS adicionado con agar en concentración 1.5 g/L.

### *Caldo nutritivo (Biokar Diagnostics, Beauvais, France)*

extracto de carne	3	g/L
peptona de carne	5	g/L
pH = 7 ± 0.2		

### *Agua peptonada tamponada (Biokar Diagnostics, Beauvais, France)*

Peptona	10.0	g/L
Cloruro de sodio	5.0	g/L
Difosfato de sodio	3.5	g/L
Fosfato de potasio	1.5	g/L
pH = 7.2 ± 0.2		

### *Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (Merck, D-64271 Darmstadt, Germany)*

Extracto de levadura	5.0	g/L
Glucosa	20.0	g/L
Cloranfenicol	0.1	g/L
Agar	14.9	g/L
pH = 6.5		

*Yeast peptone dextrose (YPD)*

Extracto de levadura	10	g/L
Peptona	20	g/L
Glucosa	20	g/L

*Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) Agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France)*

Extracto de levadura	3.0	g/L
L-lisina	5.0	g/L
Lactosa	7.5	g/L
Sacarosa	7.5	g/L
Xilosa	3.5	g/L
Desoxicolato de sodio	2.5	g/L
Cloruro de sodio	5.0	g/L
Tiosulfato de sodio	6.8	g/L
Citrato férrico de amonio	0.8	g/L
Rojo fenol	80.0	mg/L
Agar	13.5	g/L
pH = 7.4 ± 0.2		

*Tryptona Bilis X-Glucuronido (TBX) agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France)*

Tryptona	20	g/L
Sales biliares	1.5	g/L
BCIG	75	mg/L
Agar	9	g/L
pH = 7.2 ± 0.2.		

*Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) Agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France)*

Tryptona	4.59	g/L
Hidrolizado ácido de caseína	4.59	g/L
Cloruro de sodio	7.34	g/L
Dihidrogeno fosfato de potasio	1.47	g/L
Cloruro de magnesio anhidro	10.93	g/L
Oxalacetato verde de malaquita	37.0	mg/L
Novobiocina	10	mg/L
Agar	2.70	g/L
pH = 5.2 ± 0.2		

*Müller Hinton agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France)*

Infusión de carne	2	g/L
Hidrolizado ácido de caseína	17.5	g/L
Almidón soluble	1.5	mg/L
Agar	17	g/L
pH = 7.4 ± 0.2		

*Rose Bengal Chloramphenicol agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France)*

Peptona de soja	5.0	g/L
Glucosa	10.0	g/L
Fosfato monopotásico	1.0	g/L
Sulfato de magnesio 7 H <sub>2</sub> O	0.5	g/L
Rose Bengal	50.0	mg/L
Cloranfenicol	0.1	g/L
Hidrolizado ácido de caseína	17.5	g/L
Infusión de carne	2.0	mg/L
Almidón soluble	1.5	g/L
Agar	13.0	g/L
pH = 7.4 ± 0.2		

*Caldo LB*

Triptona	10	g/L
Extracto de levadura	5	g/L
NaCl	5	g/L
pH = 7		

*Agar papa glucosado (Britania S.A., Buenos Aires, Argentina)*

Infusión de papa	4	g/L
dextrosa	20	g/L
Agar	15	g/L
pH = 5.6 ± 0.2		

*Rapid-Salmonella (BIO-RAD, Paris, France)*

Peptona de caseína	5	g/L
Extracto de carne	5	g/L
Agentes selectivos	14	g/L
Mezcla cromogénica	310	mg/L
Agar	12.7	g/L
pH = 7.2 ± 0.2		



*Medio Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) completo*

Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM), Gibco, Grand Island, N.Y., USA	1000	ml
Penicilina/ Streptomycin (1000 IU, 1000µg/ml)	13	ml
Suero fetal bovino	180	ml
Aminoácidos no esenciales	13	ml
Gentamicina (50 mg/ml)	10	ml
Fungizona	5	ml
HNaCO <sub>3</sub>	2	g/l
pH = 7 ± 0,2		

El suero fetal bovino se inactiva 30 minutos a 60 °C. Una vez preparado, el medio se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0.22 µm.

*Medio DMEM de adhesión*

Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM), Gibco, Grand Island, N.Y., USA	1000	ml
NaHCO <sub>3</sub>	2	g/l
pH = 7 ± 0,2		

Una vez preparado, el medio se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0.22 µm.

**2. Buffer y reactivos***Buffer fosfato*

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.1M)	50	ml
NaOH (0.1M)	29.1	ml
Agua	c.s.p	100ml
pH = 7 ± 0.2		

*Buffer TE*

Tris-HCl (pH 8.0)	10	mM
EDTA (pH 8.0)	1	mM
pH = 8.0	1.0	g/L

*Buffer PBS*

NaCl	8.02	g/l
KCl	0.231	g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.17	g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2	g/l

*Buffer TAE 50x*

Tris-base	242	g/L
Ácido acético glacial	57.1	ml/L
EDTA 0.5 M (pH 8)	100	ml/L
Agua miliQ	c.s.p	1000 ml

*Buffer liticasa*

Sorbitol	0.9	M
Tris-HCl (pH 8)	0.1	M
EDTA	0.1	M

*Buffer lizosima o TES*

Tris-HCl	50	mM
Sacarosa	50	g/L
EDTA	5	mM
pH = 8		

*Reactivo de Antrona*

Antrona (9, 10 dihidro-9-oxoantraceno, Mallinckrodt)	0.5	g/L
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	66 %	p/v
Agua destilada	c.s.p	1 L

Para la obtención del reactivo de Antrona se preparó primero una mezcla 66 % v/v de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en agua. Debido a la naturaleza fuertemente exotérmica de la disolución se trabajó en baño de agua-hielo. Cuando la solución anterior estuvo a una temperatura de aproximadamente 70 °C, y para facilitar su disolución, se agregó antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno, Mallinckrodt) en concentración final de 0.5 g/L. El reactivo se conservó de 0 a 4 °C y utilizó dentro de los 15 días posteriores a su preparación.

*Solución de esporos*

Lauril Sulfato de Sodio	0.001	g/L
Glucosa	0.1	g/L

*Solución TSS-2X (para preparación de células competentes de Escherichia coli)*

PEG 8000	2	g
DSMO	1	ml
MgCl <sub>2</sub> 1M	0.7	ml
Medio LB estéril	c.s.p	10 ml
Filtrar con membrana de 0.22 µm y conservar a -20 °C		

*Solución de tripsina*

Tripsina	0.75	g/L
EDTA	0.2	g/L
PBS	c.s.p	1L

**3. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante: reactivos, preparación de geles y tinción****3.1 Reactivos***Solución de Acrilamida-bisacrilamida 40 %*

Acrilamida	38.93	g
Bisacrilamida	1.07	g
Agua destilada	c.s.p	100 ml

Filtrar con membrana 0.45  $\mu\text{m}$  y almacenar a 4 °C

*Soluciones para preparar geles de acrilamida 8 % con gradiente desnaturizante*

	0 % desnaturizante	80 % desnaturizante
Acrilamida-Bis 40%	20 ml	20 ml
Buffer TAE 50X	2 ml	2 ml
Urea	-	33.6 g
Formamida deionizada	-	32 ml
Agua destilada	c.s.p 100 ml	c.s.p 100 ml

*Soluciones desnaturizantes de trabajo*

Concentración desnaturizante	Solución 0 % desnaturizante	Solución 80 % desnaturizante
30 %	7,19 ml	4,31 ml
40 %	5,75 ml	5,75 ml
60 %	2,87 ml	8,63 ml
70 %	1,45 ml	10,05 ml

*Persulfato de amonio 10 %*

Persulfato de amonio	0.1	g
Agua destilada	c.s.p	1.0 ml

Fraccionar y almacenar a -20 °C

*Buffer muestra*

Azul de bromofenol 2 %	0.25	ml
Xileno cianol 2 %	0.25	ml
Glicerol 100 %	7.00	ml
Agua destilada	2.50	ml

*Solución stacking*

Acrilamida 0 %	5	ml
Temed	5	μl
Persulfato de amonio 10 %	5	μl

*Soluciones colorantes*

1. Bromuro de etidio	2	μg/ml en buffer TAE
2. Sybr Gold	0.2	μl/ml en buffer TAE

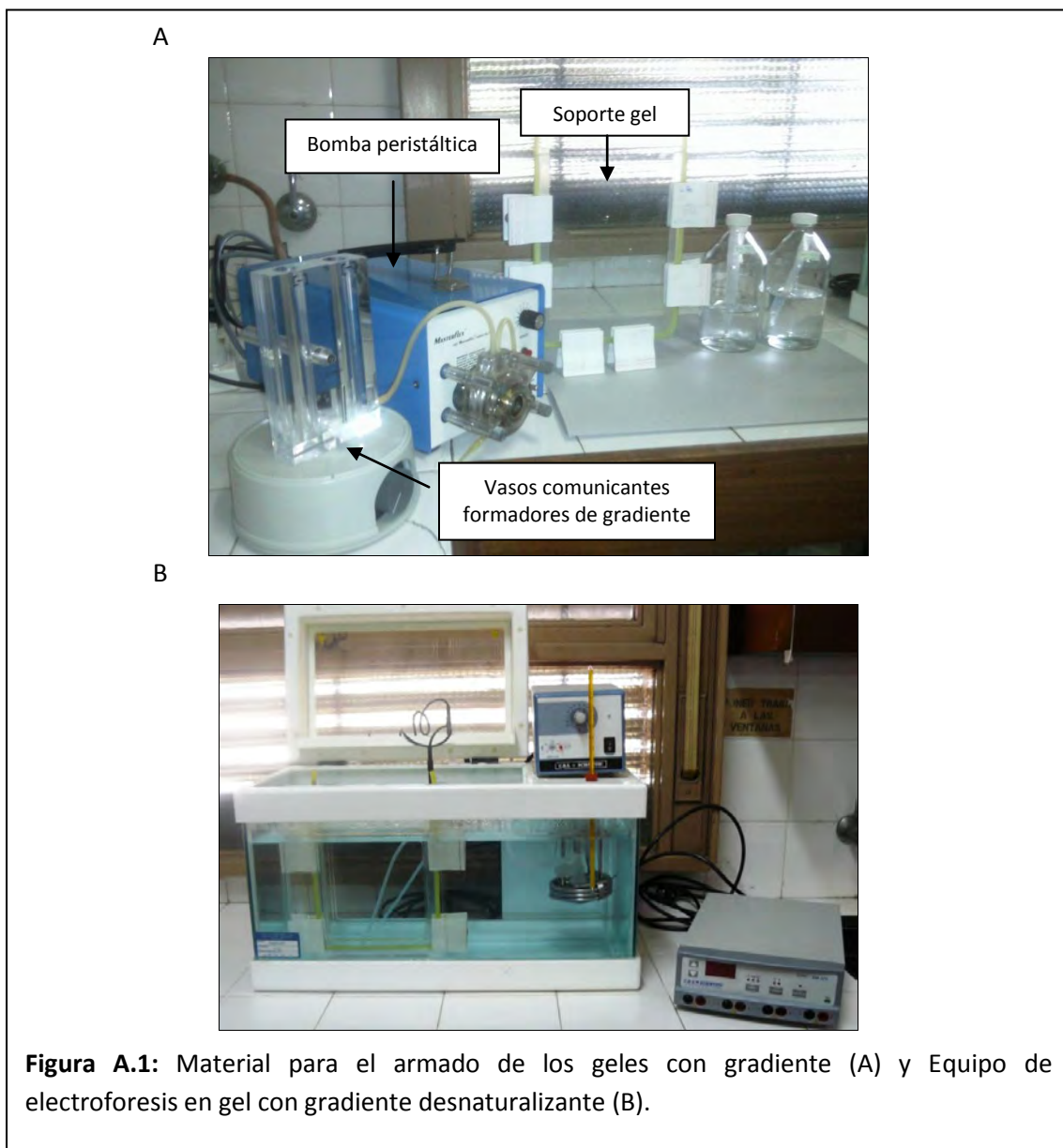
**3.2 Preparación de los geles y siembra**

Los geles con gradiente desnaturante se prepararon empleando un sistema con 2 vasos comunicantes conectados a una bomba peristáltica. Se prepararon 2 soluciones con distinta concentración de urea-formamida, indicadas anteriormente como soluciones desnaturantes de trabajo. Inmediatamente antes de su utilización, se agregaron a cada solución 4.4 μl de TEMED y 44 μl de persulfato de amonio 10 %. Las mismas se colocaron en los vasos comunicantes, aquella con mayor concentración de urea-formamida se colocó en el vaso más cercano al conducto de salida y se agitó durante la preparación del gel con un agitador magnético. Las soluciones fueron luego vertidas entre vidrios mediante una bomba peristáltica empleada a la mínima velocidad. Se colocó el peine formador de calles y el gel se dejó polimerizar. Posteriormente se completó el espacio, generado por la contracción del gel causada por la gelificación, con solución *stacking*.

Una vez formado el gel, los vidrios conteniendo el mismo se montaron sobre el soporte correspondiente y se colocaron en la cuba con buffer TAE a 60 °C. Luego se sembraron en cada fosa 20 μl de muestra con 5 μl de buffer muestra para productos PCR obtenidos a partir de ADN proveniente de comunidades microbianas y 7 μl de muestra + 3 μl de buffer muestra para amplicones de ADN de cepas aisladas.

### 3.3 Tinción

Una vez finalizada la electroforesis los soportes conteniendo los geles fueron retirados de la cuba y desmontados. Los vidrios se separaron cuidadosamente de manera que el gel quede sobre uno de ellos. Luego el gel sobre el vidrio se colocó durante 30 min en un recipiente conteniendo buffer TAE con bromuro de etidio o con Syber Gold (Invitrogen, USA) en las concentraciones indicadas anteriormente. Los geles se observaron en un transiluminador (DyNA Light™ UV Transilluminator, LABNET TM-26) con longitud de onda 320 nm y se fotografiaron con una cámara Panasonic DCM-228.



# Bibliografía

---



- Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (1999). Characterization of kefir grains grown in cows' milk and in soya milk. *Journal of Dairy Research*, 66(2), 327-333.
- Alkhalif, A., Alhaj, M., & Al-Homidan, I. (2010). Influence of probiotic supplementation on blood parameters and growth performance in broiler chickens. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17(3), 219-225.
- Altier, C. (2005). Genetic and environmental control of salmonella invasion. *Journal of Microbiology*, 43, 85-92.
- Al-Zenki, S. F., Al-Nasser, A. Y., Al-Saffar, A. E., Abdullah, F. K., Al-Bahouh, M. E., Al-Haddad, A. S., et al. (2009). Effects of using a chicken-origin competitive exclusion culture and probiotic cultures on reducing salmonella in broilers. *Journal of Applied Poultry Research*, 18(1), 23-29.
- Anadón, A., Rosa Martínez-Larrañaga, M., & Aranzazu Martínez, M. (2006). Probiotics for animal nutrition in the european union. regulation and safety assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45(1), 91-95.
- Anastassiadis, S., Morgunov, I. G., Kamzolova, S. V., & Finogenova, T. V. (2008). Citric acid production patent review. *Recent Patents on Biotechnology*, 2(2), 107-123.
- Angulo, L., Lopez, E., & Lema, C. (1993). Microflora present in kefir grains of the galician region (north-west of spain). *Journal of Dairy Research*, 60(2), 263-267.
- Annous, B. A., Kozempel, M. F., & Kurantz, M. J. (1999). Changes in membrane fatty acid composition of pediococcus sp. strain NRRL B-2354 in response to growth conditions and its effect on thermal resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 2857-2862.
- Apajalahti, J., Kettunen, A., & Graham, H. (2004). Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poultry Science Journal*, 60(2), 223-232+249+252+255+259+262.
- Apata, D. F. (2008). Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of lactobacillus bulgaricus. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(7), 1253-1258.
- Applegate, T. J., Klose, V., Steiner, T., Ganner, A., & Schatzmayr, G. (2010). Probiotics and phytochemicals for poultry: Myth or reality? *Journal of Applied Poultry Research*, 19(2), 194-210.



Araujo, R., & Rodrigues, A. G. (2004). Variability of germinative potential among pathogenic species of aspergillus. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(9), 4335-4337.

Athanasiadis, I., Boskou, D., Kanellaki, M., Kiosseoglou, V., & Koutinas, A. A. (2002). Whey liquid waste of the dairy industry as raw material for potable alcohol production by kefir granules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7231-7234.

Athanasiadis, I., Paraskevopoulou, A., Blekas, G., & Kiosseoglou, V. (2004). Development of a novel whey beverage by fermentation with kefir granules. effect of various treatments. *Biotechnology Progress*, 20(4), 1091-1095.

Atterbury, R. J., Van Bergen, M. A. P., Ortiz, F., Lovell, M. A., Harris, J. A., De Boer, A., et al. (2007). Bacteriophage therapy to reduce salmonella colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4543-4549.

Audic, J., Chaufer, B., & Daufin, G. (2003). Non-food applications of milk components and dairy co-products: A review. *Lait*, 83(6), 417-438.

Awad, W. A., Ghareeb, K., Abdel-Raheem, S., & Böhm, J. (2009). Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry Science*, 88(1), 49-55.

Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, Third Edition, Revised and Expanded*, edited by Salminen, S., von Wrigth, A., & Ouwehand, A. (Marcel Dekker, Inc). ISBN: 0-8247-5332-1.

Azarakhsh, Y., Sabokbar, A., & Bayat, M. (2011). Incidence of the most common toxigenic aspergillus species in broiler feeds in kermanshah province, west of iran. *Global Veterinaria*, 6(1), 73-77.

Bahrain Pour, J., & Kermanshahi, H. (2010). Effects of cecal cultures and a commercial probiotic (PremaLac®) on performance and serum lipids of broiler chickens. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(10), 1506-1509.

Baker, D. H., & Han, Y. (1994). Ideal amino acid profile for chicks during the first three weeks posthatching. *Poultry Science*, 73(9), 1441-1447.

Barbosa, A. F., Santos, P. G., Lucho, A. M. S., & Schneedorf, J. M. (2011). Kefiran can disrupt the cell membrane through induced pore formation. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 653(1-2), 61-66.



- Barrow, P. A. (2007). Salmonella infections: Immune and non-immune protection with vaccines. *Avian Pathology*, 36(1), 1-13.
- Beernaert, L. A., Pasmans, F., van Waeyenberghe, L., Haesebrouck, F., & Martel, A. (2010). Aspergillus infections in birds: A review. *Avian Pathology*, 39(5), 325-331.
- Bensmira, M., Nsabimana, C., & Jiang, B. (2010). Effects of fermentation conditions and homogenization pressure on the rheological properties of kefir. *LWT - Food Science and Technology*, 43(8), 1180-1184.
- Berghman, L. R., Abi-Ghanem, D., Waghela, S. D., & Ricke, S. C. (2005). Antibodies: An alternative for antibiotics? *Poultry Science*, 84(4), 660-666.
- Bernet, M. F., Brassart, D., Neeser, J. R., & Servin, A. L. (1994). Lactobacillus acidophilus LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*, 35(4), 483-489.
- Beshkova, D. M., Simova, E. D., Simov, Z. I., Frengova, G. I., & Spasov, Z. N. (2002). Pure cultures for making kefir. *Food Microbiology*, 19(5), 537-544.
- Beshkova, D. M., Simova, E. D., Frengova, G. I., Simov, Z. I., & Dimitrov, Zh. P. (2003). Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. *International Dairy Journal* 13(7), 529-535.
- Bhunja, A.K. (2008). Foodborne Microbial Pathogens. Ed Springer Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA. ISBN: 978-0-387-74536-7.
- Bielke, L. R., Higgins, S. E., Donoghue, A. M., Donoghue, D. J., Hargis, B. M., & Tellez, G. (2007). Use of wide-host-range bacteriophages to reduce salmonella on poultry products. *International Journal of Poultry Science*, 6(10), 754-757.
- Bjerrum, L., Engberg, R. M., Leser, T. D., Jensen, B. B., Finster, K., & Pedersen, K. (2006). Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poultry Science*, 85(7), 1151-1164.
- Blankenship, L. C., Bailey, J. S., Cox, N. A., Stern, N. J., Brewer, R., & Williams, O. (1993). Two-step mucosal competitive exclusion flora treatment to diminish salmonellae in commercial broiler chickens. *Poultry Science*, 72(9), 1667-1672.

- Bolla, P. (2010). Tesis doctoral: Desarrollo de un alimento funcional deshidratado constituido por microorganismos aislados de kefir. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Bolla, P. A., De Los Angeles Serradell, M., De Urraza, P. J., & De Antoni, G. L. (2011). Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. *Journal of Dairy Research*, 78(1), 15-22.
- Bottazzi, V., & Bianchi, F. (1980). A note on scanning electron microscopy of microorganisms associated with the kefir granule. *Journal of Applied Bacteriology*, 48(2), 265-268.
- Bottazzi, V., Zacconi, C., Sarra, P. G., Dallavalle, P., & Parisi, M. G. (1994). Kefir: Microbiologia, Chimica e Tecnologia. *Industria del Latte*, 30(1), 41-62.
- Bouguettoucha, A., Balannec, B., & Amrane, A. (2011). Unstructured models for lactic acid fermentation - a review. *Food Technology and Biotechnology*, 49(1), 3-12.
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2000). Salmonella nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2465-2467.
- Brialy, C., Rivalland, P., Coiffard, L., & De Roeck Holtzhauer, Y. (1995). Microbiological study of lyophilized dairy kefir. *Folia Microbiologica*, 40(2), 198-200.
- Brul, S., Coote, P., Oomes, S., Mensonides, F., Hellingwerf, K., & Klis, F. (2002). Physiological actions of preservative agents: Prospective of use of modern microbiological techniques in assessing microbial behaviour in food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1-2), 55-64.
- Brumell, J. H., Marcus, S. L., & Finlay, B. B. (2000). N-terminal conservation of putative type III secreted effectors of salmonella typhimurium. *Molecular Microbiology*, 36(3), 773-774.
- Burns, P., Vinderola, G., Molinari, F., & Reinheimer, J. (2008). Suitability of whey and buttermilk for the growth and frozen storage of probiotic lactobacilli. *International Journal of Dairy Technology*, 61(2), 156-164.
- Buser, M. D., & Abbas, H. K. (2002). Effects of extrusion temperature and dwell time on aflatoxin levels in cottonseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2556-2559.
- Byrd, J. A., Hargis, B. M., Caldwell, D. J., Bailey, R. H., Herron, K. L., McReynolds, J. L., et al. (2001). Effect of lactic acid administration in the drinking water during preslaughter feed

withdrawal on salmonella and campylobacter contamination of broilers. *Poultry Science*, 80(3), 278-283.

Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., & Chadee, K. (2007). The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(1), G315-G322.

Cabo, M.L., Braber, A.F. and Koenraad, P. (2002) Apparent anti- fungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. *J. Food Protect.* 65, 1309-1316.

Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2), 131-149.

Carmelo, V., Santos, R., Viegas, C. A., & Sá-Correia, I. (1998). Modification of *saccharomyces cerevisiae* thermotolerance following rapid exposure to acid stress. *International Journal of Food Microbiology*, 42(3), 225-230.

Carpenter, C. E., & Broadbent, J. R. (2009). External concentration of acid anions and pH: key independent variables for studying how organic acids inhibit growth of bacteria in mildly acid foods. *Journal of Food Science*, 74(1), 12-15.

CAST (2003) Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems, Task Force Report N°. 139. Ames, IA, USA: Council for Agricultural Science and Technology.

Cenesiz, S., Yaman, H., Ozcan, A., Kart, A., & Karademir, G. (2008). Effects of kefir as a probiotic on serum cholesterol, total lipid, aspartate amino transferase and alanine amino transferase activities in broiler chicks. *Medycyna Weterynaryjna*, 64(2), 168-170.

Cevikbas, A., Yemni, E., Ezzedenn, F. W., Yardimici, T., Cevikbas, U., & Stohs, S. J. (1994). Antitumoural antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. *Phytotherapy Research*, 8(2), 78-82.

CFSPH. (2005). Salmonellosis, paratyphoid non-typhoidal salmonellosis. URL. <http://www.cfsph.iastate.edu>.

Chambers, J. R., & Gong, J. (2011). The intestinal microbiota and its modulation for salmonella control in chickens. *Food Research International*, 44(10), 3149-3159.

Chantret, I., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Brot-Laroche, E., Zweibaum, A., et al. (1994). Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late

passages of the cell line caco-2: Evidence for glucose-dependent negative regulation. *Journal of Cell Science*, 107(1), 213-225.

Chaveerach, P., Keuzenkamp, D. A., Lipman, L. J. A., & Van Knapen, F. (2004). Effect of organic acids in drinking water for young broilers on campylobacter infection, volatile fatty acid production, gut microflora and histological cell changes. *Poultry Science*, 83(3), 330-334.

Chávez-Servín, J. L., Castellote, A. I., & López-Sabater, M. C. (2004). Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *Journal of Chromatography A*, 1043(2), 211-215.

Chen, M., Stern, N. J., Bailey, J. S., & Cox, N. A. (1998). Administering mucosal competitive exclusion flora for control of salmonellae. *Journal of Applied Poultry Research*, 7(4), 384-391.

Chen, H., Wang, S., & Chen, M. (2008). Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology*, 25(3), 492-501.

Chichlowski, M., Croom, J., McBride, B. W., Havenstein, G. B., & Koci, M. D. (2007a). Metabolic and physiological impact of probiotics or direct-fed-microbials on poultry: A brief review of current knowledge. *International Journal of Poultry Science*, 6(10), 694-704.

Chichlowski, M., Croom, W. J., Edens, F. W., McBride, B. W., Qiu, R., Chiang, C. C., et al. (2007b). Microarchitecture and spatial relationship between bacteria and ileal, cecal, and colonic epithelium in chicks fed a direct-fed microbial, PrimaLac, and salinomycin. *Poultry Science*, 86(6), 1121-1132.

Chimalizeni, Y., Kawaza, K., & Molyneux, E. (2010). The epidemiology and management of non typhoidal salmonella infections. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 659, 33-46.

Christensen, H. R., Frøkiær, H., & Pestka, J. J. (2002). Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *Journal of Immunology*, 168(1), 171-178.

Chumpawadee, S., Chinrasri, O., & Santaweek, S. (2009). Effect of dietary inclusion of cassava yeast as probiotic source on growth performance and carcass percentage in japanese quails. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(7), 1036-1039.

CIL (Centro de la Industria Lechera). (2003). La lechería argentina. Situación coyuntural y perspectivas. [<http://www.cil.org.ar>].

Clayton, R. A., Sutton, G., Hinkle Jr., P. S., Bult, C., & Fields, C. (1995). Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in genbank: Why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(3), 595-599.

Clément, M., Tremblay, J., Lange, M., Thibodeau, J., & Belhumeur, P. (2007). Whey-derived free fatty acids suppress the germination of candida albicans in vitro. *FEMS Yeast Research*, 7(2), 276-285.

Cocolin, L., Bisson, L. F., & Mills, D. A. (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, 189(1), 81-87.

Coconnier, M., Bernet, M., Kerneis, S., Chauviere, G., Fourniat, J., & Servin, A. L. (1993). Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal caco-2 cells by lactobacillus acidophilus strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiology Letters*, 110(3), 299-305.

Coda, R., Cassone, A., Rizzello, C. G., Nionelli, L., Cardinali, G., & Gobbetti, M. (2011). Antifungal activity of wickerhamomyces anomalus and lactobacillus plantarum during sourdough fermentation: Identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3484-3492.

Código Alimentario Argentino. Metodología Analítica Oficial, Productos lácteos: leche, pag. 135-138. Artículo 13.8 B: Determinación de materia grasa: método de Rose-Gottlieb.

Código Alimentario Argentino. Metodología Analítica Oficial, Productos lácteos: leche, pag. 139. Artículo 13.12: Determinación de cenizas.

Collado, M. C., Gueimonde, M., Sanz, Y., & Salminen, S. (2006). Adhesion properties and competitive pathogen exclusion ability of bifidobacteria with acquired acid resistance. *Journal of Food Protection*, 69(7), 1675-1679.

Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2007). Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: In vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods*, 71(1), 71-74.

Collett, S. R. (2012). Nutrition and wet litter problems in poultry. *Animal Feed Science and Technology*. Artículo en prensa. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2011.12.013

- Collington, G. K., Parker, D. S., & Armstrong, D. G. (1990). The influence of inclusion of either an antibiotic or a probiotic in the diet on the development of digestive enzyme activity in the pig. *British Journal of Nutrition*, *64*(1), 59-70.
- Conková, E., Para, L., & Kocisová, A. (1993). Inhibition of growth of microscopic fungi with organic acids. [Inhibícia rastu niektorých mikroskopických húb vybranými organickými kyselinami.] *Veterinarni Medicina*, *38*(12), 723-727.
- Consejo Directivo Europeo. (1986). Approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (86/609/EEC), 24 November 1986.
- Coote, P. J., Cole, M. B., & Jones, M. V. (1991). Induction of increased thermotolerance in *saccharomyces cerevisiae* may triggered by a mechanism involving intracellular pH. *Journal of General Microbiology*, *137*(7), 1701-1708.
- Corrier, D. E., Nisbet, D. J., Hargis, B. M., Holt, P. S., & DeLoach, J. R. (1997). Provision of lactose to molting hens enhances resistance to salmonella enteritidis colonization. *Journal of Food Protection*, *60*(1), 10-15.
- Corrier, D. E., Nisbet, D. J., Scanlan, C. M., Hollister, A. G., Caldwell, D. J., Thomas, L. A., et al. (1995). Treatment of commercial broiler chickens with a characterized culture of cecal bacteria to reduce salmonellae colonization. *Poultry Science*, *74*(7), 1093-1101.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J., & Damiani, P. (1998). Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: Identification of a mixture of organic acids produced by *lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *50*(2), 253-256.
- Cox, N. A., Bailey, J. S., Mauldin, J. M., & Blankenship, L. C. (1990). Presence and impact of salmonella contamination in commercial broiler hatcheries. *Poultry Science*, *69*(9), 1606-1609.
- Cox, N. A., Bailey, J. S., Mauldin, J. M., Blankenship, L. C., & Wilson, J. L. (1991). Extent of salmonellae contamination in breeder hatcheries. *Poultry Science*, *70*(2), 416-418.
- Cox, N. A., & Bailey, J. S. (1993). Introduction of bacteria in ovo. United States patent 5,206,015.
- Cox, J. M., & Pavic, A. (2010). Advances in enteropathogen control in poultry production. *Journal of Applied Microbiology*, *108*(3), 745-755.

- Cross, M. L. (2002). Microbes versus microbes: Immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 34(4), 245-253.
- Cummings, J. H., & MacFarlane, G. T. (1997). Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Clinical Nutrition*, 16(1), 3-11.
- Czerwiński, J., Højberg, O., Smulikowska, S., Engberg, R. M., & Mieczkowska, A. (2010). Influence of dietary peas and organic acids and probiotic supplementation on performance and caecal microbial ecology of broiler chickens. *British Poultry Science*, 51(2), 258-269.
- Dahllof, I., Baillie, H., & Kjelleberg, S. (2000). rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3376-3380.
- Dal Bello, F., Clarke, C. I., Ryan, L. A. M., Ulmer, H., Schober, T. J., Ström, K., et al. (2007). Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain lactobacillus plantarum FST 1.7. *Journal of Cereal Science*, 45(3), 309-318.
- Dalcerro, A., Magnoli, C., Chiacchiera, S., Palacios, G., & Reynoso, M. (1997). Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in argentina. *Mycopathologia*, 137(3), 179-184.
- Dalcerro, A., Magnoli, C., Luna, M., Ancasi, G., Reynoso, M. M., Chiacchiera, S., et al. (1998). Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in argentina. *Mycopathologia*, 141(1), 37-43.
- Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M., & Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria - potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21(4), 370-380.
- Dalloul, R. A., Lillehoj, H. S., Shellem, T. A., & Doerr, J. A. (2003). Intestinal immunomodulation by vitamin A deficiency and lactobacillus-based probiotic in eimeria acervulina-infected broiler chickens. *Avian Diseases*, 47(4), 1313-1320.
- Dar, A., Potter, A., Tikoo, S., Gerdts, V., Lai, K., Babiuk, L. A., et al. (2009). CpG oligodeoxynucleotides activate innate immune response that suppresses infectious bronchitis virus replication in chicken embryos. *Avian Diseases*, 53(2), 261-267.
- Davidson, P. M., & Parish, M. E. (1989). Methods for testing the efficacy of Food Antimicrobials. *Food Technology*, 43(1), 148-155.

Davidson, M. P. (2001). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.), *Food microbiology: Fundamentals and frontiers* (pp. 593–627). Washington: ASM press.

De Araújo, J. C., & Schneider, R. P. (2008). DGGE with genomic DNA: Suitable for detection of numerically important organisms but not for identification of the most abundant organisms. *Water Research*, *42*(20), 5002-5010.

De Moreno De LeBlanc, A., Matar, C., Farnworth, E., & Perdigón, G. (2007). Study of immune cells involved in the antitumor effect of kefir in a murine breast cancer model. *Journal of Dairy Science*, *90*(4), 1920-1928.

De Muynck, C., Leroy, A. I. J., De Maeseneire, S., Arnaut, F., Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (2004). Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiological Research*, *159*(4), 339-346.

De Reu, J. C., Rombouts, F. M., & Nout, M. J. R. (1995). Influence of acidity and initial substrate temperature on germination of *Rhizopus oligosporus* sporangiospores during tempe manufacture. *Journal of Applied Bacteriology*, *78*(2), 200-208.

De Simone, C. (2005). Impact of prebiotics and probiotics on enteric flora. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *40*(SUPPL. 1), S40.

De Vrese, M., Keller, B., & Barth, C. A. (1992). Enhancement of intestinal hydrolysis of lactose by microbial  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) of kefir. *British Journal of Nutrition*, *67*(1), 67-75.

Dersjant-Li, Y., Verstegen, M. W. A., & Gerrits, W. J. J. (2003). The impact of low concentrations of aflatoxin, deoxynivalenol or fumonisin in diets on growing pigs and poultry. *Nutrition Research Reviews*, *16*(2), 223-239.

Dersjant-Li, Y., Verstegen, M. W. A., & Gerrits, W. J. J. (2003). The impact of low concentrations of aflatoxin, deoxynivalenol or fumonisin in diets on growing pigs and poultry. *Nutrition Research Reviews*, *16*(2), 223-239.

Desmond, C., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Collins, K., & Paul Ross, R. (2001). Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *International Dairy Journal*, *11*(10), 801-808.



- Dhanani, A. S., Gaudana, S. B., & Bagchi, T. (2011). The ability of lactobacillus adhesin EF-tu to interfere with pathogen adhesion. *European Food Research and Technology*, 232(5), 777-785.
- Dierick, N. A. (1989). Biotechnology aids to improve feed and feed digestion: Enzymes and fermentation. *Archiv Fur Tierernahrung*, 39(3), 241-261.
- Dimitrellou, D., Kourkoutas, Y., Banat, I. M., Marchant, R., & Koutinas, A. A. (2007). Whey-cheese production using freeze-dried kefir culture as a starter. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 1170-1183.
- Dimitrellou, D., Kourkoutas, Y., Koutinas, A. A., & Kanellaki, M. (2009). Thermally-dried immobilized kefir on casein as starter culture in dried whey cheese production. *Food Microbiology*, 26(8), 809-820.
- Diosma, G. (2010). Tesis de Maestría en Higiene y Tecnología de los Alimentos: Estudio y selección de levaduras con propiedades probióticas. Universidad Nacional de La Plata.
- Doherty, S. B., Gee, V. L., Ross, R. P., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Brodkorb, A. (2010). Efficacy of whey protein gel networks as potential viability-enhancing scaffolds for cell immobilization of lactobacillus rhamnosus GG. *Journal of Microbiological Methods*, 80(3), 231-241.
- Dousset, X., & Caillet, F. (1993). Aspects microbiologiques et biochimiques de la fermentation du kefir. *Microbiologie Aliments Nutrition*, 11: 463-470.
- Doyle, M. P., & Erickson, M. C. (2006). Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. *Poultry Science*, 85(6), 960-973.
- Dunkley, K. D., Callaway, T. R., Chalova, V. I., McReynolds, J. L., Hume, M. E., Dunkley, C. S., et al. (2009). Foodborne salmonella ecology in the avian gastrointestinal tract. *Anaerobe*, 15(1-2), 26-35.
- Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., et al. (1999). Probiotics: From myth to reality. demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie Van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 76(1-4), 279-292.
- Durant, J. A., Corrier, D. E., Byrd, J. A., Stanker, L. H., & Ricke, S. C. (1999). Feed deprivation affects crop environment and modulates salmonella enteritidis colonization and invasion of leghorn hens. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 1919-1923.

Durant, J. A., Lowry, V. K., Nisbet, D. J., Stanker, L. H., Corrier, D. E., & Ricke, S. C. (2000). Late logarithmic salmonella typhimurium HEp-2 cell association and invasion response to short-chain fatty acid addition. *Journal of Food Safety*, 20(1), 1-11.

Dziva, F., & Stevens, M. P. (2008). Colibacillosis in poultry: Unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic escherichia coli in their natural hosts. *Avian Pathology*, 37(4), 355-366.

Echeverría, I., Garrote, G., & De Antoni, G. (2007) Formulación de una leche fermentada probiótica y con bajo contenido de lactosa. *Tecnología Láctea Latinoamericana* 48, 44-47.

EFSA, 2005a. European Food Safety Authority. Opinion of the scientific committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA Journal* 226, 1–12.

EFSA, 2005b. Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA Journal* 223, 1–12.

EFSA, 2007. European Food Safety Authority. 2007. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA J.* 587:1–16.

EFSA, 2008. European Food Safety Authority. Guidance for the preparation of dossiers for zotechnical additives Prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (Question No EFSA-Q-2008-403) Adopted on 16 July 2008. *he EFSA Journal* 776, 1-17.

Eichner, G., Vieira, S. L., Torres, C. A., Coneglian, J. L. B., Freitas, D. M., & Oyarzabl, O. A. (2007). Litter moisture and footpad dermatitis as affected by diets formulated on an all-vegetable basis or having the inclusion of poultry by-product. *Journal of Applied Poultry Research*, 16(3), 344-350.

Ekperigin, H. E., McCapes, R. H., Redus, R., Ritchie, W. L., Cameron, W. J., Nagaraja, K. V., & Noll, S. (1990). Microcidal effects of a new pelleting process. *Poultry Science*, 69(9), 1595-1598.

El-Loly, M., & Mahfouz, M. B. (2011). Lactoferrin in relation to biological functions and applications: A review. *International Journal of Dairy Science*, 6(2), 79-111.

Engel, V. G., Krusch, U., & Teuber, M. (1986). Mikrobiologische Zusammensetzung von Kefir. I. Helfen. *Milchwissenschaft*, 41: 418-421.

Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: Novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 297-314.

Estrada, M. A. J., Hernández, J. A. M., & Soto, L. G. (2010). Enhancement of competitive exclusion by a defined probiotic on salmonella enterica serovar enteritidis colonization during rearing of leghorn chicks. [Un probiótico definido aumenta la exclusión de Salmonella enterica serovariedad Enteritidis durante la crianza de aves ligeras] *Veterinaria Mexico*, 41(1), 25-43.

Etzel, M. R. (2004). Manufacture and use of dairy protein fractions. *Journal of Nutrition*, 134(4), 996S-1002S.

FAO/WHO (2002). Joint FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint working group report on drafting. London, Ontario, 2002: 1-11.

Farnell, M. B., Donoghue, A. M., Solis De Los Santos, F., Blore, P. J., Hargis, B. M., Tellez, G., et al. (2006). Upregulation of oxidative burst and degranulation in chicken heterophils stimulated with probiotic bacteria. *Poultry Science*, 85(11), 1900-1906.

Farrelly, V., Rainey, F. A., & Stackebrandt, E. (1995). Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7), 2798-2801.

Fennema, O. R. (1996). Characteristics of Milk. En: *Food Chemistry*. Ed. Marcel Dekker, Inc. Cap. 14, 841-878.

Fernández, M. F., Boris, S., & Barbés, C. (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 94(3), 449-455.

Fernández, A., Álvarez-Ordóñez, A., López, M., & Bernardo, A. (2009). Effects of organic acids on thermal inactivation of acid and cold stressed enterococcus faecium. *Food Microbiology*, 26(5), 497-503.

- Figuroa Ochoa, I. M., & Verdugo Rodríguez, A. (2005). Molecular mechanisms of the pathogenicity of salmonella sp. [Mecanismos moleculares de patogenicidad de Salmonella sp] *Revista Latinoamericana De Microbiologia*, 47(1-2), 25-42.
- Finlay, B. B., Ruschkowski, S., & Dedhar, S. (1991). Cytoskeletal rearrangements accompanying salmonella entry into epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 99(2), 283-296.
- Flint, J. F., & Garner, M. R. (2009). Feeding beneficial bacteria: A natural solution for increasing efficiency and decreasing pathogens in animal agriculture. *Journal of Applied Poultry Research*, 18(2), 367-378.
- Florianowicz, T. (2001). Antifungal activity of some microorganisms against *penicillium* expansion. *European Food Research and Technology*, 212(3), 282-286.
- Foegeding, E. A., Davis, J. P., Doucet, D., & McGuffey, M. K. (2002). Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science and Technology*, 13(5), 151-159.
- Fogh, J., Fogh, J. M., & Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 59(1), 221-226.
- Foley, S. L., & Lynne, A. M. (2008). Food animal-associated Salmonella challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *Journal of Animal Science* 86 (14 Suppl), E173-187.
- Fooks, L. J., & Gibson, G. R. (2002). In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(1), 67-75.
- Franco, T. S., Garcia, S., Hirooka, E. Y., Ono, Y. S., & dos Santos, J. S. (2011). Lactic acid bacteria in the inhibition of *fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification. *Journal of Applied Microbiology*, 111(3), 739-748.
- Fujisawa, T., Adachi, S., Toba, T., Arihara, K., & Mitsuoka, T. (1988). *Lactobacillus kefiranofaciens* sp. nov. isolated from kefir grains. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38(1), 12-14.
- Gabriel, I., Lessire, M., Mallet, S., & Guillot, J. F. (2006). Microflora of the digestive tract: Critical factors and consequences for poultry. *World's Poultry Science Journal*, 62(3), 499-511+544+548+551-552.

Gaggìa, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141(SUPPL.), S15-S28.

Galvin, M., Hill, C., & Ross, R. P. (1999). Lacticin 3147 displays activity in buffer against gram-positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Letters in Applied Microbiology*, 28(5), 355-358.

Gänzle, M. G., Haase, G., & Jelen, P. (2008). Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *International Dairy Journal*, 18(7), 685-694.

Garbers, I., Britz, T. J., & Witthuhn, R. C. (2004). PCR-based denaturing gradient gel electrophoretic typification and identification of the microbial consortium present in kefir grains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(7), 687-693.

García Quintans, N., Blancato, V., Repizo, G., Magni, C., & López, P. (2008). Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria. In: *Molecular Aspects of Lactic Acid Bacteria for Traditional and New Applications*. Editors: Mayo, B.; López, P., & Pérez-Martínez, G. 65-88. ISBN: 978-81-308-0250-3.

Garrido, M. N., Skjervheim, M., Oppegaard, H., & Sørum, H. (2004). Acidified litter benefits the intestinal flora balance of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5208-5213.

Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (1997). Preservation of kefir grains, a comparative study. *LWT - Food Science and Technology*, 30(1), 77-84.

Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (1998). Characteristics of kefir prepared with different grain:Milk ratios. *Journal of Dairy Research*, 65(1), 149-154.

Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2000). Inhibitory power of kefir: The role of organic acids. *Journal of Food Protection*, 63(3), 364-369.

Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 68(4), 639-652.

Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2010a). Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink. In: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*. Editors: Mozzi, F., Raya, R., & Vignolo, M. 327-340 of 393. ISBN 978-0-8138-1583-1 Blackwell Publishing Ames USA.

Garrote, G. L., Golowczyc, M., Piermaría, J., Londero, A., Boya, P., León Peláez, A., Kakisu, E. J., Dini, C., de Urza, P. J., De Antoni, G. L. & Abraham, A. G. (2010b). Biopreservación de

alimentos. En “Aspectos probióticos y tecnológicos de bacterias lácticas”. ISBN: 978-84-96023-96-3. Editor Andrea Gómez-Zavaglia. Editorial de la UNPL. La Plata, Argentina.

Gast, R. K., & Benson, S. T. (1996). Intestinal colonization and organ invasion in chicks experimentally infected with salmonella enteritidis phage type 4 and other phage types isolated from poultry in the united states. *Avian Diseases*, 40(4), 853-857.

Gauthier, S. F., Pouliot, Y., & Saint-Sauveur, D. (2006). Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1315-1323.

Gerez, C. L., Torino, M. I., Rollán, G., & Font de Valdez, G. (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*, 20(2), 144-148.

Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125(6), 1401-1412.

Gill, H. S., Doull, F., Rutherfurd, K. J., & Cross, M. L. (2000). Immunoregulatory peptides in bovine milk. *British Journal of Nutrition*, 84(SUPPL. 1), S111-S117.

Gill, H. S., & Rutherfurd, K. J. (2001). Immune enhancement conferred by oral delivery of lactobacillus rhamnosus HN001 in different milk-based substrates. *Journal of Dairy Research*, 68(4), 611-616.

Gimeo, A., & Martins, M. L. (2011). Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos. Ed. Special Nutrients, INC. 2766 SW Douglas Road, Miami, FL 33133 USA.

Golden, N. J., Marks, H. H., Coleman, M. E., Schroeder, C. M., Bauer Jr., N. E., & Schlosser, W. D. (2008). Review of induced molting by feed removal and contamination of eggs with salmonella enterica serovar enteritidis. *Veterinary Microbiology*, 131(3-4), 215-228.

Golfinopoulos, A., Kopsahelis, N., Tsaousi, K., Koutinas, A. A., & Soupioni, M. (2011). Research perspectives and role of lactose uptake rate revealed by its study using 14C-labelled lactose in whey fermentation. *Bioresource Technology*, 102(5), 4204-4209.

Golowczyc, M. A., Mobili, P., Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2007). Protective action of lactobacillus kefir carrying S-layer protein against salmonella enterica serovar enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*, 118(3), 264-273.

Golowczyc, M. A., Gugliada, M. J., Hollmann, A., Delfederico, L., Garrote, G. L., Abraham, A. G., et al. (2008). Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: Potential use as probiotic. *Journal of Dairy Research*, 75(2), 211-217.

Golowczyc, M. A. (2008). Tesis doctoral: Caracterización taxonómica, probiótica y tecnológica de lactobacilos aislados de kefir. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

Golowczyc, M. A., Silva, J., Abraham, A. G., De Antoni, G. L., & Teixeira, P. (2010). Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. *Letters in Applied Microbiology*, 50(1), 7-12.

Gong, J., Yu, H., Liu, T., Gill, J. J., Chambers, J. R., Wheatcroft, R., et al. (2008). Effects of zinc bacitracin, bird age and access to range on bacterial microbiota in the ileum and caeca of broiler chickens. *Journal of Applied Microbiology*, 104(5), 1372-1382.

González Siso, M. I. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology*, 57(1), 1-11.

Goren, E., de Jong, W. A., Doornenbal, P., Bolder, N. M., Mulder, R. W., & Jansen, A. (1988). Reduction of salmonella infection of broilers by spray application of intestinal microflora: A longitudinal study. *Veterinary Quarterly*, 10(4), 249-255.

Goren, E., de Jong, W. A., Doornenbal, P., Koopman, J. P., & Kennis, H. M. (1984). Protection of chicks against salmonella infection induced by spray application of intestinal microflora in the hatchery. *Veterinary Quarterly*, 6(2), 73-79.

Gourama, H., & Bullerman, L. B. (1997). Anti-aflatoxigenic activity of lactobacillus casei pseudoplantarum. *International Journal of Food Microbiology*, 34(2), 131-143.

Grewal, H. S., & Kalra, K. L. (1995). Fungal production of citric acid. *Biotechnology Advances*, 13(2), 209-234.

Grønnevik, H., Falstad, M., & Narvhus, J. A. (2011). Microbiological and chemical properties of norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*, 21(9), 601-606.

Guan, L. L., Hagen, K. E., Tannock, G. W., Korver, D. R., Fasenko, G. M., & Allison, G. E. (2003). Detection and identification of lactobacillus species in crops of broilers of different ages by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6750-6757.

Guimarães, P. M. R., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2010). Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 28(3), 375-384.

Gulmez, M., & Guven, A. (2003). Survival of escherichia coli O157:H7, listeria monocytogenes 4b and yersinia enterocolitica O3 in different yogurt and kefir combinations as prefermentation contaminant. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 631-636.

Gusils, C., Oppezzo, O., Pizarro, R., & González, S. (2003). Adhesion of probiotic lactobacilli to chick intestinal mucus. *Canadian Journal of Microbiology*, 49(7), 472-478.

Guzel-Seydim, Z. B., Kok-Tas, T., Greene, A. K., & Seydim, A. C. (2011). Review: Functional properties of kefir. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(3), 261-268.

Güzel-Seydim, Z. B., Seydim, A. C., Greene, A. K., & Bodine, A. B. (2000). Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13(1), 35-43.

Guzel-Seydim, Z., Kok-Tas, T., Ertekin-Filiz, B., & Seydim, A. C. (2011). Effect of different growth conditions on biomass increase in kefir grains. *Journal of Dairy Science*, 94(3), 1239-1242.

Gyles, C. L. (2008). Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* 9(2), 149-158.

Hakkak, R., Korourian, S., Ronis, M. J. J., Johnston, J. M., & Badger, T. M. (2001). Dietary whey protein protects against azoxymethane-induced colon tumors in male rats. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 10(5), 555-558.

Halpin, R. M., Brady, D. B., O'Riordan, E. D., & O'Sullivan, M. (2010). Untreated and enzyme-modified bovine whey products reduce association of salmonella typhimurium, escherichia coli O157:H7 and cronobacter malonaticus (formerly enterobacter sakazakii) to CaCo-2 cells. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), 406-415.

Han, J. H., & Krochta, J. M. (1999). Wetting properties and water vapor permeability of whey-protein-coated paper. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 42(5), 1375-1382.

Hansen, M. C., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., & Molin, S. (1998). Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiology Ecology*, 26(2), 141-149.



- Harta, O., Iconomopoulou, M., Bekatorou, A., Nigam, P., Kontominas, M., & Koutinas, A. A. (2004). Effect of various carbohydrate substrates on the production of kefir grains for use as a novel baking starter. *Food Chemistry*, *88*(2), 237-242.
- Hatew, B., Delessa, T., Zakin, V., & Gollop, N. (2011). Antagonistic intestinal microflora produces antimicrobial substance inhibitory to pseudomonas species and other spoilage organisms. *Journal of Food Science*, *76*(8), M522-M530.
- Hayaloglu, A. A., & Karagul-Yuceer, Y. (2011). Utilization and characterization of small ruminants' milk and milk products in turkey: Current status and new perspectives. *Small Ruminant Research*, *101*(1-3), 73-83.
- Helander, I. M., Von Wright, A., & Mattila-Sandholm, T. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, *8*(5), 146-150.
- Heres, L., Engel, B., Van Knapen, F., De Jong, M. C. M., Wagenaar, J. A., & Urlings, H. A. P. (2003). Fermented liquid feed reduces susceptibility of broilers for salmonella enteritidis. *Poultry Science*, *82*(4), 603-611.
- Hertzler, S. R., & Clancy, S. M. (2003). Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*, *103*(5), 582-587.
- Hesna Sahin E., & Yardimci, M. (2009). Effects of kefir as a probiotic on growth performance and carcass characteristics hi geese (Anser anser). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, *8*(3), 562-567.
- Higgins, J. P., Higgins, S. E., Guenther, K. L., Huff, W., Donoghue, A. M., Donoghue, D. J., et al. (2005). Use of a specific bacteriophage treatment to reduce salmonella in poultry products. *Poultry Science*, *84*(7), 1141-1145.
- Higgins, S. E., Higgins, J. P., Wolfenden, A. D., Henderson, S. N., Torres-Rodriguez, A., Tellez, G., et al. (2008). Evaluation of a lactobacillus-based probiotic culture for the reduction of salmonella enteritidis in neonatal broiler chicks. *Poultry Science*, *87*(1), 27-31.
- Higgins, J. P., Higgins, S. E., Wolfenden, A. D., Henderson, S. N., Torres-Rodriguez, A., Vicente, J. L., et al. (2010). Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on salmonella enteritidis in neonatal broilers. *Poultry Science*, *89*(2), 243-247.

Hinton, M., & Linton, A. H. (1988). Control of salmonella infections in broiler chickens by the acid treatment of their feed. *Veterinary Record*, 123(16), 416-421.

Hlastan-Ribič, C., Cerar, A., Pokorn, D., Perše, M., & Zebič, A. (2005). Effects of kefir containing various levels of fat on chemically induced colorectal epithelial tumors in wistar rats. *Nutrition Research*, 25(1), 55-63.

Hofacre, C. L., Froyman, R., Gautrias, B., George, B., Goodwin, M. A., & Brown, J. (1998). Use of Aviguard and other intestinal bioproducts in experimental clostridium perfringens-associated necrotizing enteritis in broiler chickens. *Avian Diseases*, 42(3), 579-584.

Houshmand, M., Azhar, K., Zulkifli, I., Bejo, M. H., & Kanya, A. (2011). Effects of nonantibiotic feed additives on performance, nutrient retention, gut pH, and intestinal morphology of broilers fed different levels of energy. *Journal of Applied Poultry Research*, 20(2), 121-128.

Hudault, S., Lievin, V., Bernet-Camard, M. F., & Servin, A. L. (1997). Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 513-518.

Hugo, A. A., Kakisu, E., De Antoni, G. L., & Pérez, P. F. (2008). Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in vitro. *Letters in Applied Microbiology*, 46(6), 613-619.

Illanés, A. (2011). Whey upgrading by enzyme biocatalysis. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(6) Retrieved from [www.scopus.com](http://www.scopus.com).

Illian, J. B., Prosser, J. I., Baker, K. L., & Rangel-Castro, J. I. (2009). Functional principal component data analysis: A new method for analysing microbial community fingerprints. *Journal of Microbiological Methods*, 79(1), 89-95.

International Organization for Standardization. (2007). Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. ISO 6579:2002 + Cor.1:2004 + Amd 1:2007. International Organization for Standardization, Geneva.

International Organization for Standardization. (2009). Animal feeding stuffs. Determination of contents of calcium, copper, iron, magnesium, manganese, potassium, sodium and zinc. Method using atomic absorption spectrometry. ISO 6869. International Organization for Standardization, Geneva.

International Organization for Standardization. (2009). Animal feeding stuffs-determination of nitrogen content and calculation of crude protein content- Part 2: Block digestion/steam distillation method. ISO 5983-2. International Organization for Standardization, Geneva.

Ismail, A. A., Ghaly, M. F., & El-Naggar, A. K. (2011). Milk kefir: Ultrastructure, antimicrobial activity and efficacy on aflatoxin b1 production by *aspergillus flavus*. *Current Microbiology*, 62(5), 1602-1609.

Iwasawa, S., Ueda, M., Miyata, N., Hirota, T., & Ahiko, K. (1982). Identification and fermentation character of kefir yeast. *Agricultural and biological chemistry*. 46, 2631– 2636.

Jianzhong, Z., Xiaoli, L. B., Hanhu, J., & Mingsheng, D. (2009). Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*, 26, 770–775.

Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., & Jalaludin, S. (2000). Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *lactobacillus* cultures. *Poultry Science*, 79(6), 886-891.

Kabir, S. M. L. (2009). The role of probiotics in the poultry industry. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(8), 3531-3546.

Kakisu, E. J., Abraham, A. G., Pérez, P. F., & De Antoni, G. L. (2007). Inhibition of *bacillus cereus* in milk fermented with kefir grains. *Journal of Food Protection*, 70(11), 2613-2616.

Kakisu, E. (2010). Tesis doctoral: Desarrollo y optimización del proceso para la elaboración de leches fermentadas con microorganismos aislados de gránulos de kefir con características tecnológicas y probióticas definidas. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

Kakisu, E., Irigoyen, A., Torre, P., De Antoni, G. L., & Abraham, A. G. (2011). Physicochemical, microbiological and sensory profiles of fermented milk containing probiotic strains isolated from kefir. *Journal of Dairy Research*, 78(4), 456-463.

Kanagawa, T. (2003). Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(4), 317-323.

Kandler, O., & Kunath, P. (1983). *Lactobacillus kefir* sp. nov., a component of the microflora of kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, 4(2), 286-294.

- Kankaanpää, P. E., Salminen, S. J., Isolauri, E., & Lee, Y. K. (2001). The influence of polyunsaturated fatty acids on probiotic growth and adhesion. *FEMS Microbiology Letters*, 194(2), 149-153.
- Karagözlü, N., Karagözlü, C., & Ergönül, B. (2007). Survival characteristics of *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* and *S. aureus* during kefir fermentation. *Czech Journal of Food Sciences*, 25(4), 202-207.
- Katechaki, E., Panas, P., Rapti, K., Kandilogiannakis, L., & Koutinas, A. A. (2008). Production of hard-type cheese using free or immobilized freeze-dried kefir cells as a starter culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13), 5316-5323.
- Katechaki, E., Panas, P., Kourkoutas, Y., Koliopoulos, D., & Koutinas, A. A. (2009). Thermally-dried free and immobilized kefir cells as starter culture in hard-type cheese production. *Bioresource Technology*, 100(14), 3618-3624.
- Kesenkaş, H., Dinkç, N., Seçkin, K., Kinik, O., Siddik, G., Ergönül, P. G., et al. (2011). Physicochemical, microbiological and sensory characteristics of soymilk kefir. *African Journal of Microbiology Research*, 5(22), 3737-3746.
- Kim, J. S., Ingale, S. L., Kim, Y. W., Kim, K. H., Sen, S., Ryu, M. H., et al. (2011). Effect of supplementation of multi-microbe probiotic product on growth performance, apparent digestibility, cecal microbiota and small intestinal morphology of broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, Artículo en prensa DOI: 10.1111/j.1439-0396.2011.01187.x
- Kirchmayr, M. R., Segura-Garcia, L. E., Flores-Berrios, E. P., & Gschaedler, A. (2011). Strategy for the extraction of yeast DNA from artisan agave must for quantitative PCR analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112(5), 518-521.
- Klappenbach, J. A., Saxman, P. R., Cole, J. R., & Schmidt, T. M. (2001). Rnndb: The ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Research*, 29(1), 181-184.
- Klingberg, T. D., Lesnik, U., Arneborg, N., Raspor, P., & Jespersen, L. (2008). Comparison of *saccharomyces cerevisiae* strains of clinical and nonclinical origin by molecular typing and determination of putative virulence traits. *FEMS Yeast Research*, 8(4), 631-640.
- Klose, V., Mohnl, M., Plail, R., Schatzmayr, G., & Loibner, A. (2006). Development of a competitive exclusion product for poultry meeting the regulatory requirements for registration in the European Union. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50(6), 563-571.

- Knap, I., Lund, B.; Kehlet, A.B., Hofacre, C., & Mathis, G. (2010). *Bacillus licheniformis* prevents necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Diseases* 54(2), 931-935.
- Knap, I., Kehlet, A. B., Bennedsen, M., Mathis, G. F.; Hofacre, C. L., Lumpkins, B. S., Jensen, M. M., Raun, M., & Lay, A. (2011). *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers. *Poultry Science*, 90(8), 1690-1694.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960.
- Koroleva, N. S. (1988). Starters for fermented milks, section 4: kefir and kumys starters. *Bulletin of the International Dairy Federation* 227: 3540.
- Koroleva, N. S. (1991). Products prepared with lactic acid bacteria and yeasts. In: Robinson, R.K., editor. Therapeutic properties of fermented milks: 159-179. *Elsevier Applied Sciences Publishers*, London, UK.
- Kostrzynska, M., & Bachand, A. (2006). Use of microbial antagonism to reduce pathogen levels on produce and meat products: A review. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(11), 1017-1026.
- Kourkoutas, Y., Psarianos, C., Koutinas, A. A., Kanellaki, M., Banat, I. M., & Marchant, R. (2002). Continuous whey fermentation using kefir yeast immobilized on delignified cellulosic material. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2543-2547.
- Kourkoutas, Y., Kandylis, P., Panas, P., Dooley, J. S. G., Nigam, P., & Koutinas, A. A. (2006). Evaluation of freeze-dried kefir coculture as starter in feta-type cheese production. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 6124-6135.
- Koutinas, A. A., Athanasiadis, I., Bekatorou, A., Iconomopoulou, M., & Blekas, G. (2005). Kefir yeast technology: Scale-up in SCP production using milk whey. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(7), 788-796.
- Koutinas, A. A., Athanasiadis, I., Bekatorou, A., Psarianos, C., Kanellaki, M., Agouridis, N., et al. (2007). Kefir-yeast technology: Industrial scale-up of alcoholic fermentation of whey, promoted by raisin extracts, using kefir-yeast granular biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(5), 576-582.
- Koutinas, A. A., Bekatorou, A., Katechaki, E., Dimitrellou, D., Kopsahelis, N., Papapostolou, H., et al. (2010). Scale-up of thermally dried kefir production as starter culture for hard-type

cheese making: An economic evaluation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(6), 1734-1743.

Krebs, H. A., D. Wiggins, M. Stubbs, A. Sols, and F. Bedoya. 1983. Studies on the mechanism of the anti-fungal action of benzoate. *Biochem. J.* 214: 657–663.

Krnjaja, V., Stojanović, L., Trenkovski, S., Bijelić, Z., & Tomašević, D. (2010). The frequency of pathogenic fungi genera in poultry feed. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 8(3-4 PART 1), 589-591.

Kumura, H., Tanoue, Y., Tsukahara, M., Tanaka, T., & Shimazaki, K. (2004). Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *Journal of Dairy Science*, 87(12), 4050-4056.

Labuda, R., & Tančinová, D. (2006). Fungi recovered from slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenity. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 13(2), 193-200.

Laitila, A., Alakomi, H., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., & Haikara, A. (2002). Antifungal activities of two lactobacillus plantarum strains against fusarium moulds in vitro and in malting of barley. *Journal of Applied Microbiology*, 93(4), 566-576.

Lammers, K. M., Brigidi, P., Vitali, B., Gionchetti, P., Rizzello, F., Caramelli, E., et al. (2003). Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 38(2), 165-172.

Lan, G. Q., Abdullah, N., Jalaludin, S., & Ho, Y. W. (2002). Culture conditions influencing phytase production of mitsuokella jalaludinii, a new bacterial species from the rumen of cattle. *Journal of Applied Microbiology*, 93(4), 668-674.

Lan, Y., Verstegen, M. W. A., Tamminga, S., & Williams, B. A. (2005). The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. *World's Poultry Science Journal*, 61(1), 95-104.

Lan, G., Abdullah, N., Jalaludin, S., & Ho, Y. W. (2012). Effects of freeze-dried mitsuokella jalaludinii culture and natuphos® phytase supplementation on the performance and nutrient utilisation of broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(2), 266-273.

Latorre-García, L., Del Castillo-Agudo, L., & Polaina, J. (2007). Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 785-791.

- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., & Gobbetti, M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough lactobacillus plantarum strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 4084-4090.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., & Visconti, A. (2003). Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 634-640.
- Lawhon, S. D., Maurer, R., Suyemoto, M., & Altier, C. (2002). Intestinal short-chain fatty acids alter salmonella typhimurium invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Molecular Microbiology*, 46(5), 1451-1464.
- LeBlanc, J., Fliss, I., & Matar, C. (2004). Induction of a humoral immune response following an escherichia coli O157:H7 infection with an immunomodulatory peptidic fraction derived from lactobacillus helveticus-fermented milk. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(6), 1171-1181.
- Lebman, D. A., & Edmiston, J. S. (1999). The role of TGF- $\beta$  in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes and Infection*, 1(15), 1297-1304.
- Lee, Y., Puong, K., Ouwehand, A. C., & Salminen, S. (2003). Displacement of bacterial pathogens from mucus and caco-2 cell surface by lactobacilli. *Journal of Medical Microbiology*, 52(10), 925-930.
- Lee, S., Lillehoj, H. S., Park, D. W., Hong, Y. H., & Lin, J. J. (2007). Effects of pediococcus- and saccharomyces-based probiotic (MitoMax<sup>®</sup>) on coccidiosis in broiler chickens. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 30(4), 261-268.
- Lee, N., Lee, J., Kwak, H., & Paik, H. (2008). Perspectives for the industrial use of bacteriocin in dairy and meat industry. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 28(1), 1-8.
- Lee, C., Yao, C., Liu, Y., Young, S., & Chang, K. (2009). Kazachstania wufongensis sp. nov., an ascosporegenous yeast isolated from soil in taiwan. *Antonie Van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 95(4), 335-341.
- Lee, K., Lillehoj, H. S., & Siragusa, G. R. (2010). Direct-fed microbials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens. *Journal of Poultry Science*, 47(2), 106-114.

- León Peláez, A. M., Serna Cataño, C. A., Quintero Yepes, E. A., Gamba Villarroel, R. R., De Antoni, G. L., & Giannuzzi, L. (2012). Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation. *Food Control*, *24*(1-2), 177-183.
- Li, S. P., Zhao, X. J., & Wang, J. Y. (2009). Synergy of astragalus polysaccharides and probiotics (*Lactobacillus* and *Bacillus cereus*) on immunity and intestinal microbiota in chicks. *Poultry Science*, *88*(3), 519-525.
- Lin, C., Chen, H., & Liu, J. (1999). Identification and characterisation of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in taiwan. *Australian Journal of Dairy Technology*, *54*(1), 14-18.
- Lin, C., Tsai, H., Lin, P., Tsen, H., & Tsai, C. (2008a). *Lactobacillus acidophilus* LAP5 able to inhibit the salmonella choleraesuis invasion to the human caco-2 epithelial cell. *Anaerobe*, *14*(5), 251-255.
- Lin, Y., Chang, B. C. H., Chiang, P., & Tang, S. (2008b). Questionable 16S ribosomal RNA gene annotations are frequent in completed microbial genomes. *Gene*, *416*(1-2), 44-47.
- Lindgren, S. E., & Dobrogosz, W. J. (1991). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, *87*(1-2), 149-163.
- Line, J. E. (2002). *Campylobacter* and *salmonella* populations associated with chickens raised on acidified litter. *Poultry Science*, *81*(10), 1473-1477.
- Liu, J., & Lin, C. (2000). Production of kefir from soymilk with or without added glucose, lactose, or sucrose. *Journal of Food Science*, *65*(4), 716-721.
- Liu, J., Wang, S., Chen, M., Chen, H., Yueh, P., & Lin, C. (2006). Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soymilk-kefir in cholesterol-fed hamsters. *British Journal of Nutrition*, *95*(5), 939-946.
- Liu, J., Wang, S., Lin, Y., & Lin, C. (2002). Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. *Nutrition and Cancer*, *44*(2), 182-187.
- Lopitz-Otsoa, F., Rementeria, A., Elguezabal, N., & Garaizar, J. (2006). Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana De Micología*, *23*(2), 67-74.
- Loretan, T., Mostert, J. F., & Viljoen, B. C. (2003). Microbial flora associated with south african household kefir. *South African Journal of Science*, *99*(1-2), 92-94.



- Loureiro, V. (2000). Spoilage yeasts in foods and beverages: Characterisation and ecology for improved diagnosis and control. *Food Research International*, 33(3-4), 247-256.
- Lu, J., Idris, U., Harmon, B., Hofacre, C., Maurer, J. J., & Lee, M. D. (2003). Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6816-6824.
- Lutful Kabir, S. M. (2010). Avian colibacillosis and salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(1), 89-114.
- Maassen, C. B. M., Van Holten-Neelen, C., Balk, F., Heijne Den Bak-Glashouwer, M., Leer, R. J., Laman, J. D., et al. (2000). Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered lactobacillus strains. *Vaccine*, 18(23), 2613-2623.
- Maccaferri, S., Klinder, A., Brigidi, P., Cavina, P., & Costabile, A. (2012). Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus fragilis* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and PBMCs and impacts on the human gut microbiota in an in vitro colonic model system. *Applied and Environmental Microbiology* 78(4), 956-64.
- Maciorowski, K. G., Jones, F. T., Pillai, S. D., & Ricke, S. C. (2004). Incidence, sources, and control of foodborne salmonella spp. in poultry feeds. *World's Poultry Science Journal*, 60(4), 446-457.
- Maciorowski, K. G., Herrera, P., Jones, F. T., Pillai, S. D., & Ricke, S. C. (2007). Effects on poultry and livestock of feed contamination with bacteria and fungi. *Animal Feed Science and Technology*, 133(1-2), 109-136.
- Mackey, B. M., Kelly, A. F., Colvin, J. A., Robbins, P. T., & Fryer, P. J. (2006). Predicting the thermal inactivation of bacteria in a solid matrix: Simulation studies on the relative effects of microbial thermal resistance parameters and process conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 107(3), 295-303.
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., & Xavier Malcata, F. (2007). Bovine whey proteins - overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40(10), 1197-1211.
- Maeda, H., Zhu, X., Omura, K., Suzuki, S., & Kitamura, S. (2004). Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. *BioFactors (Oxford, England)*, 22(1-4), 197-200.

Magalhães, K. T., Pereira, M. A., Nicolau, A., Dragone, G., Domingues, L., Teixeira, J. A., et al. (2010). Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: Evaluation of morphological and microbial variations. *Bioresource Technology*, *101*(22), 8843-8850.

Magalhães, K. T., Dias, D. R., de Melo Pereira, G. V., Oliveira, J. M., Domingues, L., Teixeira, J. A., de Almeida e Silva, J. B., & Schwan, R. F. (2011a). Chemical composition and sensory analysis of cheese whey-based beverages using kefir grains as starter culture. *International Journal of Food Science and Technology*, *46*(4), 871-878.

Magalhães, K. T., Dragone, G., De Melo Pereira, G. V., Oliveira, J. M., Domingues, L., Teixeira, J. A., Silva, J. B. A., & Schwan, R. F. (2011b). Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. *Food Chemistry*, *126*(1), 249-253.

Magnoli, C., Hallak, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Chiacchiera, S. M., Palacio, G., et al. (2005). Surveillance of toxigenic fungi and ochratoxin A in feedstuffs from córdoba province, argentina. *Veterinary Research Communications*, *29*(5), 431-445.

Magnusson, J., & Schnürer, J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(1), 1-5.

Magnusson, J. (2003). Tesis Doctoral: Antifungal Lactic acid Bacteria. Swedish University of Agricultural Sciences.

Makanjuola, D. B., Tymon, A., & Springham, D. G. (1992). Some effects of lactic acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentations. *Enzyme and Microbial Technology*, *14*(5), 350-357.

Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., et al. (2006). Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards salmonella enterica serovar typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Research in Microbiology*, *157*(3), 241-247.

Maldonado Galdeano, C., De Moreno De Leblanc, A., Vinderola, G., Bibas Bonet, M. E., & Perdígón, G. (2007). Proposed model: Mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clinical and Vaccine Immunology*, *14*(5), 485-492.

Marteau, P., Seksik, P., Lepage, P., & Doré, J. (2004). Cellular and physiological effects of probiotics and prebiotics. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, *4*(8), 889-896.

Martins, F. S., Dalmasso, G., Arantes, R. M. E., Doye, A., Lemichez, E., Lagadec, P., Imbert, V., Peyron, J. F.; Rampal, P., Nicoli, J. R.; & Czerucka, D. (2010). Interaction of *saccharomyces boulardii* with *salmonella enterica* serovar typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection. *PLoS ONE*, 5(1) art. N°. e8925 5 (1) pp 1-12.

Mathers, J. J., Flick, S. C., Cox, L. A. (2011). Longer-duration uses of tetracyclines and penicillins in U.S. food-producing animals: Indications and microbiologic effects. *Environment International*, 37(5), 991-1004.

Mazaheri Assadi, M., Abdolmaleki, F., & Mokarrame, R. R. (2008). Application of whey in fermented beverage production using kefir starter culture. *Nutrition and Food Science*, 38(2), 121-127.

McDonald, P., Hendersoon, N. & Heron, S. (1991). *The Biochemistry of Silage* second ed. Chalcombe Publications.

McHugh, T. H., & Krochta, J. M. (1994). Sorbitol- vs glycerol-plasticized whey protein edible films: Integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(4), 841-845.

McReynolds, J. L., Byrd, J. A., Genovese, K. J., Poole, T. L., Duke, S. E., Farnell, M. B., et al. (2007). Dietary lactose and its effect on the disease condition of necrotic enteritis. *Poultry Science*, 86(8), 1656-1661.

McReynolds, J., Waneck, C., Byrd, J., Genovese, K., Duke, S., & Nisbet, D. (2009). Efficacy of multistrain direct-fed microbial and phyto-genetic products in reducing necrotic enteritis in commercial broilers. *Poultry Science*, 88(10), 2075-2080.

Mead, G. C. (2000). Prospects for 'competitive exclusion' treatment to control salmonellas and other foodborne pathogens in poultry. *Veterinary Journal*, 159(2), 111-123.

Medrano, M., Pérez, P. F., & Abraham, A. G. (2008). Kefiran antagonizes cytopathic effects of *bacillus cereus* extracellular factors. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1-2), 1-7.

Medrano, M., Hamet, M. F., Abraham, A. G., & Pérez, P. F. (2009). Kefiran protects caco-2 cells from cytopathic effects induced by *bacillus cereus* infection. *Antonie Van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 96(4), 505-513.

Medrano, M., Racedo, S. M., Rolny, I. S., Abraham, A. G., & Pérez, P. F. (2011). Oral administration of kefir induces changes in the balance of immune cells in a murine model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(10), 5299-5304.

Meijerhof, R., & Hulet, R. M. (1997). In ovo injection of competitive exclusion culture in broiler hatching eggs. *Journal of Applied Poultry Research*, *6*, 260-266.

Melin, P., Stratford, M., Plummridge, A., & Archer, D. B. (2008). Auxotrophy for uridine increases the sensitivity of aspergillus niger to weak-acid preservatives. *Microbiology*, *154*(4), 1251-1257.

Menconi, A., Wolfenden, A. D., Shivaramaiah, S., Terraes, J. C., Urbano, T., Kuttel, J., Kremer, C., Hargis, B. M., Tellez, G. (2011). Effect of lactic acid bacteria probiotic culture for the treatment of Salmonella enterica serovar Heidelberg in neonatal broiler chickens and Turkey poults. *Poultry Science* *90*(3), 561-565.

Michaelidou, A., & Steijns, J. (2006). Nutritional and technological aspects of minor bioactive components in milk and whey: Growth factors, vitamins and nucleotides. *International Dairy Journal*, *16*(11), 1421-1426.

Montalto, M., Maggiano, N., Ricci, R., Curigliano, V., Santoro, L., Di Nicuolo, F., et al. (2004). Lactobacillus acidophilus protects tight junctions from aspirin damage in HT-29 cells. *Digestion*, *69*(4), 225-228.

Morgan, S. M., Hickey, R., Ross, R. P., & Hill, C. (2000). Efficient method for the detection of microbially produced antibacterial substances from food systems. *Journal of Applied Microbiology*, *89*(1), 56-62.

Mor-Mur, M., & Yuste, J. (2010). Emerging bacterial pathogens in meat and poultry: An overview. *Food and Bioprocess Technology*, *3*(1), 24-35.

Mountzouris, K. C., Tsirtsikos, P., Kalamara, E., Nitsch, S., Schatzmayr, G., & Fegeros, K. (2007). Evaluation of the efficacy of a probiotic containing lactobacillus, bifidobacterium, enterococcus, and pediococcus strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. *Poultry Science*, *86*(2), 309-317.

Mountzouris, K. C., Balaskas, C., Xanthakos, I., Tziviniou, A., & Fegeros, K. (2009). Effects of a multi-species probiotic on biomarkers of competitive exclusion efficacy in broilers challenged with salmonella enteritidis. *British Poultry Science*, *50*(4), 467-478.

- Mountzouris, K. C., Tsitrsikos, P., Palamidi, I., Arvaniti, A., Mohnl, M., Schatzmayr, G., et al. (2010). Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. *Poultry Science*, *89*(1), 58-67.
- Mullin, W. J., & Emmons, D. B. (1997). Determination of organic acids and sugars in cheese, milk and whey by high performance liquid chromatography. *Food Research International*, *30*(2), 147-151.
- Murofushi, M., Shiomi, M., & Aibara, K. (1983). Effect of orally administered polysaccharide from kefir grain on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, *36*(1), 49-53.
- Murry, A. C., Hinton, A., & Morrison, H. (2004). Inhibition of growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Clostridia perfringens* on chicken feed media by *Lactobacillus salivarius*, and *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Poultry Science* *3*(9), 603-607.
- Muyzer, G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, *2*(3), 317-322.
- Muyzer, G., & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *73*(1), 127-141.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, *59*(3), 695-700.
- Mylvaganam, H., Bjorvatn, B., Hofstad, T., Hjetland, R., Hoiby, E. A., & Holm, S. E. (1994). Small-fragment restriction endonuclease analysis in epidemiological mapping of group A streptococci. *Journal of Medical Microbiology*, *40*(4), 256-260.
- Mynott, T. L., Crossett, B., & Prathalingam, S. R. (2002). Proteolytic inhibition of salmonella enterica serovar typhimurium-induced activation of the mitogen-activated protein kinases ERK and JNK in cultured human intestinal cells. *Infection and Immunity*, *70*(1), 86-95.

Namroud, N. F., Shivazad, M., & Zaghari, M. (2008). Effects of fortifying low crude protein diet with crystalline amino acids on performance, blood ammonia level, and excreta characteristics of broiler chicks. *Poultry Science*, *87*(11), 2250-2258.

Nascimento De Araújo, A., & Giugliano, L. G. (2000). Human milk fractions inhibit the adherence of diffusely adherent escherichia coli (DAEC) and enteroaggregative E. coli (EAEC) to HeLa cells. *FEMS Microbiology Letters*, *184*(1), 91-94.

Nava, G. M., Attene-Ramos, M. S., Gaskins, H. R., & Richards, J. D. (2009). Molecular analysis of microbial community structure in the chicken ileum following organic acid supplementation. *Veterinary Microbiology*, *137*(3-4), 345-353.

Nielsen, P. V., & de Boer, E. (2000). Food preservatives against fungi. In R. A. Samson, E. S. Hoekstra, J. C. Frisvad, & O. Filtenborg (Eds.), *Introduction to food- and airborne fungi* (pp. 357-363). Utrecht: Centraal Bureau voor Schimmelcultures.

Niku-Paavola, M., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T., & Haikara, A. (1999). New types of antimicrobial compounds produced by lactobacillus plantarum. *Journal of Applied Microbiology*, *86*(1), 29-35.

Ninane, V., Mukandayambaje, R., & Berben, G. (2007). Identification of lactic acid bacteria within the consortium of a kefir grain by sequencing 16S rDNA variable regions. *Journal of AOAC International*, *90*(4), 1111-1117.

Norma Portuguesa. (1986). *Microbiologia alimentar. Regras gerais para pesquisa de Escherichia coli*. NP 2308 (1986). Instituto Portugues da Qualidade, Lisboa

Norma Portuguesa. (1994). *Alimentos para animais. Determinação do teor de humidade*. 3ª Edição. NP 875. Instituto Portugues da Qualidada, Lisboa.

Norma Portuguesa. (2000). *Alimentos para animais. Determinação do teor do fósforo total- Método Espectrofotométrico*. 3ª Edição. NP 874. Instituto Portugues da Qualidada, Lisboa.

Noy, Y., & Sklan, D. (1999). Energy utilization in newly hatched chicks. *Poultry Science*, *78*(12), 1750-1756.

Nuotio, L., Schneitz, C., Halonen, U., & Nurmi, E. (1992). Use of competitive exclusion to protect newly-hatched chicks against intestinal colonisation and invasion by salmonella enteritidis PT4. *British Poultry Science*, *33*(4), 775-779.

Nurmi, E.; Rantala M.W. 1973. New aspect of salmonella infection in broiler production. *Nature* 241:210–211.

Ogier, J., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., & Delacroix-Buchet, A. (2002). Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3691-3701.

Okelo, P. O., Wagner, D. D., Carr, L. E., Wheaton, F. W., Douglass, L. W., & Joseph, S. W. (2006). Optimization of extrusion conditions for elimination of mesophilic bacteria during thermal processing of animal feed mash. *Animal Feed Science and Technology*, 129(1-2), 116-137.

Okkers, D. J., Dicks, L. M. T., Silvester, M., Joubert, J. J., & Odendaal, H. J. (1999). Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *Journal of Applied Microbiology*, 87(5), 726-734.

Organización Internacional para la Estandarización. (2007). Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. Modificación 1: Anexo D: Detección de *Salmonella* spp. en heces de animales y en muestras ambientales en la etapa de producción primaria. (ISO 6579:2002/A1:2007). Organización Internacional para la Estandarización, Geneva.

Ostling, C. E., & Lindgren, S. E. (1993). Inhibition of enterobacteria and listeria growth by lactic, acetic and formic acids. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(1), 18-24.

Ottogalli, G., Galli, A., Resmini, P., & Volonterio, G. (1973). Composizione microbiologica, chimica ed ultrastruttura dei granuli di kefir. *Annuario Microbiologia*, 23, 109–121.

Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: An overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 82(1-4), 279-289.

Papenburg, R., Bounous, G., Fleiszer, D., & Gold, P. (1990). Dietary milk proteins inhibit the development of dimethylhydrazine-induced malignancy. *Tumor Biology*, 11(3), 129-136.

Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(3), 521-542.



- Paraskevopoulou, A., Athanasiadis, I., Kanellaki, M., Bekatorou, A., Blekas, G., & Kiosseoglou, V. (2003). Functional properties of single cell protein produced by kefir microflora. *Food Research International*, 36(5), 431-438.
- Parveen, S., Taabodi, M., Schwarz, J. G., Oscar, T. P., Harter-Dennis, J., & White, D. G. (2007). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* recovered from processed poultry. *Journal of Food Protection*, 70, 2466-2472.
- Patterson, J. A., & Burkholder, K. M. (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*, 82(4), 627-631.
- Paulsson, M., Hegg, P., & Castberg, H. B. (1985). Thermal stability of whey proteins studied by differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta*, 95(2), 435-440.
- Pei, A. Y., Oberdorf, W. E., Nossa, C. W., Agarwal, A., Chokshi, P., Gerz, E. A., et al. (2010). Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12), 3886-3897.
- Pescuma, M., Hébert, E. M., Mozzi, F., & Font de Valdez, G. (2010). Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 141(1-2), 73-81.
- Piermaria, J. A., de la Canal, M. L., & Abraham, A. G. (2008). Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1520-1527.
- Piermaria, J. A., Pinotti, A., Garcia, M. A., & Abraham, A. G. (2009). Films based on kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 684-690.
- Piermaria, J., Bosch, A., Pinotti, A., Yantorno, O., Garcia, M. A., & Abraham, A. G. (2011). Kefiran films plasticized with sugars and polyols: Water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1261-1269.
- Pines, O., Even-Ram, S., Elnathan, N., Battat, E., Aharonov, O., Gibson, D., et al. (1996). The cytosolic pathway of L-malic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The role of fumarase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(4), 393-399.
- Pines, O., Shemesh, S., Battat, E., & Goldberg, I. (1997). Overexpression of cytosolic malate dehydrogenase (MDH2) causes overproduction of specific organic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(2), 248-255.



- Pintado, M. E., Lopes Da Silva, J. A., Fernandes, P. B., Xavier Malcata, F., & Hogg, T. A. (1996). Microbiological and rheological studies on portuguese kefir grains. *International Journal of Food Science and Technology*, 31(1), 15-26.
- Pinto, M., Robine Leon, S., & Appay, M. D. (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line caco-2 in culture. *Biology of the Cell*, 47(3), 323-330.
- Piper, P. W. (1993). Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 11(4), 339-355.
- Piper, P. W. (2011). Resistance of yeasts to weak organic acid food preservatives. *Advances in Applied Microbiology*, 77, 97-113.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). Fungi and food spoilage. Ed. Springer, Dordrecht Heidelberg, London, New York. ISBN 978-0-387-92206-5.
- Pivnick, H., & Nurmi, E. (1982). The Nurmi concept and its role in the control of Salmonella in poultry. In R. Davies (Ed.), *Developments in food microbiology 1* (pp. 41–70). Barking, Essex, England: Applied Science Publishers Ltd.
- Plessas, S., Pherson, L., Bekatorou, A., Nigam, P., & Koutinas, A. A. (2005). Bread making using kefir grains as baker's yeast. *Food Chemistry*, 93(4), 585-589.
- Plessas, S., Trantallidi, M., Bekatorou, A., Kanellaki, M., Nigam, P., & Koutinas, A. A. (2007). Immobilization of kefir and lactobacillus casei on brewery spent grains for use in sourdough wheat bread making. *Food Chemistry*, 105(1), 187-194.
- Plumridge, A., Hesse, S. J. A., Watson, A. J., Lowe, K. C., Stratford, M., & Archer, D. B. (2004). The weak acid preservative sorbic acid inhibits conidial germination and mycelial growth of *aspergillus niger* through intracellular acidification. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3506-3511.
- Polz, M. F., & Cavanaugh, C. M. (1998). Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3724-3730.
- Potturi, P. V. L., Patterson, J. A., & Applegate, T. J. (2005). Effects of delayed placement on intestinal characteristics in turkey poults. *Poultry Science*, 84(5), 816-824.

- Pourahmad, R., Moghimi, A., Dadkhah, S., & Assadi, M. M. (2011). Evaluation of flavor and aroma compounds amounts in kefir from soymilk. *World Applied Sciences Journal*, 15(5), 673-676.
- Powell, J. E., Witthuhn, R. C., Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2007). Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate lactobacillus plantarum ST8KF. *International Dairy Journal*, 17(3), 190-198.
- Presser, K. A., Ratkowsky, D. A., & Ross, T. (1997). Modelling the growth rate of escherichia coli as a function of pH and lactic acid concentration. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2355-2360.
- Prieto, C. A., Guadix, E. M., & Guadix, A. (2010). Recent patents on whey protein hydrolysates manufactured by proteolysis coupled to membrane ultrafiltration. *Recent Patents on Chemical Engineering*, 3(2), 115-128.
- Pumfrey, L., & Nelson, C. E. (1991). Use of a most probable number method modified with a deoxyribonucleic probe to monitor control by food preservatives of natural salmonella contamination in animal meat meals. *Poultry Science*, 70(4), 780-784.
- Pundir, R. K., & Jain, P. (2010). Screening for antifungal activity of commercially available chemical food preservatives. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 5(2), 25-27.
- Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L., & Recio, I. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *Journal of Dairy Science*, 88(10), 3480-3487.
- Radfar, M., & Farhoomand, P. (2008). The role of probiotic and source of lactose as feed additives on performance and gut improvement in broilers. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 3(3), 179-182.
- Rahimi, S., Shiraz, Z. M., Salehi, T. Z., Karimi Torshizi, M. A., & Grimes, J. L. (2007). Prevention of salmonella infection in poultry by specific egg-derived antibody. *International Journal of Poultry Science*, 6(4), 230-235.
- Rahimi, S., Kathariou, S., Grimes, J. L., & Siletzky, R. M. (2011). Effect of direct-fed microbials on performance and clostridium perfringens colonization of turkey poults. *Poultry Science*, 90(11), 2656-2662.

- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, *118*(2), 229-241.
- Rastogi, R., Wu, M., Dasgupta, I., & Fox, G. E. (2009). Visualization of ribosomal RNA operon copy number distribution. *BMC Microbiology*, *9*, 208.
- Rawal, S., Kim, J. E., & Coulombe, R. (2010). Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Research in Veterinary Science*, *89*(3), 325-331.
- Revolledo, L., Ferreira, A. J. P., & Mead, G.C. (2006). Prospects in 519 Salmonella Control: Competitive Exclusion, Probiotics, and Enhancement of Avian Intestinal Immunity. *Journal of Applied Poultry Research*, *15*, 341-351.
- Rimada, P. S., & Abraham, A. G. (2001). Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. *Journal of Dairy Research*, *68*(4), 653-661.
- Rimada, P. S., & Abraham, A. G. (2003). Comparative study of different methodologies to determine the exopolysaccharide produced by kefir grains in milk and whey. *Lait*, *83*(1), 79-87.
- Rochette, F., Engelen, M., & Vanden Bossche, H. (2003). Antifungal agents of use in animal health - practical applications. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, *26*(1), 31-53.
- Rodicio, M., Herrero, A., Rodríguez, I., García, P., Montero, I., Beutlich, J., Rodicio, R., Guerra, B., & Mendoza, M. C. (2011). Acquisition of antimicrobial resistance determinants by virulence plasmids specific for nontyphoid serovars of *Salmonella enterica*. *Reviews in Medical Microbiology*, *22*(3), 55-65.
- Rodrigues, K. L., Gaudino Caputo, L. R., Tavares Carvalho, J. C., Evangelista, J., & Schneedorf, J. M. (2005). Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *25*(5), 404-408.
- Rohm, H., Eliskases-Lechner, F., & Brauer, M. (1992). Diversity of yeasts in selected dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*, *72*(5), 370-376.
- Romanin, D., Serradell, M., González Maciel, D., Lausada, N., Garrote, G. L., & Rumbo, M. (2010). Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. *International Journal of Food Microbiology*, *140*(2-3), 102-108.

- Rosi, J., & Rossi, J. (1978). The kefir microorganisms: The lactic acid bacteria. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 29, 291–305.
- Roy, U., Batish, V. K., Grover, S., & Neelakantan, S. (1996). Production of antifungal substance by lactococcus lactis subsp. lactis CHD-28.3. *International Journal of Food Microbiology*, 32(1-2), 27-34.
- Ryan, M. P., Rea, M. C., Hill, C., & Ross, R. P. (1996). An application in cheddar cheese manufacture for a strain of lactococcus lactis producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 612-619.
- Saberfar, E., Pourakbari, B., Chabokdavan, K., & Taj Dolatshahi, F. (2008). Antimicrobial susceptibility of escherichia coli isolated from iranian broiler chicken flocks, 2005-2006. *Journal of Applied Poultry Research*, 17(2), 302-304.
- Saito, T. (2008). Antihypertensive peptides derived from bovine casein and whey proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 606, 295-317.
- Salama, N. R., & Falkow, S. (1999). Genomic clues for defining bacterial pathogenicity. *Microbes and Infection*, 1(8), 615-619.
- Saleemi, M. K., Khan, M. Z., Khan, A., & Javed, I. (2010). Mycoflora of poultry feeds and mycotoxins producing potential of aspergillus species. *Pakistan Journal of Botany*, 42(1), 427-434.
- Samanya, M., & Yamauchi, K. (2002). Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried bacillus subtilis var. natto. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 133(1), 95-104.
- Samli, H. E., Senkoylu, N., Koc, F., Kanter, M., & Agha, A. (2007). Effects of enterococcus faecium and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and intestinal microbiota. *Archives of Animal Nutrition*, 61(1), 42-49.
- Sanders, M. E., & Huis In't Veld, J. (1999). Bringing a probiotic-containing functional food to the market: Microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie Van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 76(1-4), 293-315.
- Sanglard, D. (2002). Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Current Opinion in Microbiology*, 5(4), 379-385.

- Santini, C., Baffoni, L., Gaggia, F., Granata, M., Gasbarri, R., Di Gioia, D., et al. (2010). Characterization of probiotic strains: An application as feed additives in poultry against campylobacter jejuni. *International Journal of Food Microbiology*, 141(SUPPL.), S98-S108.
- Santos, A., San Mauro, M., Sanchez, A., Torres, J. M., & Marquina, D. (2003). The antimicrobial properties of different strains of lactobacillus spp. isolated from kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(3), 434-437.
- Sathe, S. J., Nawani, N. N., Dhakephalkar, P. K., & Kapadnis, B. P. (2007). Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2622-2628.
- Saxelin, M.; Korpela, R. & Mäyrä-Mäkinen, A. (2003). Classifying Functional Dairy Products. Capítulo 1 en: Functional Dairy Products. Eds: Mattila-Sandholm, T. y Saarela, M. Woodhead Publishing in Food Science and Technology. CRS Press. Cambridge.
- Schachtsiek, M., Hammes, W. P., & Hertel, C. (2004). Characterization of lactobacillus coryniformis DSM 20001T surface protein cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7078-7085.
- Schaller, A. (2009). Sueros de lechería. *Alimentos Argentinos* 44, 21-24.
- Scheirlinck, I., Van Der Meulen, R., Van Schoor, A., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., Vandamme, P., et al. (2008). Taxonomic structure and stability of the bacterial community in belgian sourdough ecosystems as assessed by culture and population fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2414-2423.
- Schellenberg, J., Smoragiewicz, W., & Karska-Wysocki, B. (2006). A rapid method combining immunofluorescence and flow cytometry for improved understanding of competitive interactions between lactic acid bacteria (LAB) and methicillin-resistant S. aureus (MRSA) in mixed culture. *Journal of Microbiological Methods*, 65(1), 1-9.
- Schillinger, U., Geisen, R., & Holzapfel, W. H. (1996). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science and Technology*, 7(5), 158-164.
- Schneitz, C., Hakkinen, M., Nuotio, L., Nurmi, E., & Mead, G. (1990). Droplet application for protecting chicks against salmonella colonisation by competitive exclusion. *Veterinary Record*, 126(20), 510.

Schneitz, C. (1992). Research note: Automated droplet application of a competitive exclusion preparation. *Poultry Science*, 71(12), 2125-2128.

Schneitz, C. (2005). Competitive exclusion in poultry - 30 years of research. *Food Control*, 16(8 SPEC. ISS.), 657-667.

Schnürer, J., & Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science and Technology*, 16(1-3), 70-78.

Schoeni, J. L., & Wong, A. C. L. (1994). Inhibition of campylobacter jejuni colonization in chicks by defined competitive exclusion bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(4), 1191-1197.

Schrezenmeir, J., & De Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2 SUPPL.), 361S-364S.

Schwartz, H., & Radler, F. (1988). Formation of l(-)-malate by saccharomyces cerevisiae during fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27(5-6), 553-560.

Schwenninger, S. M., Von Ah, U., Niederer, B., Teuber, M., & Meile, L. (2005). Detection of antifungal properties in lactobacillus paracasei subsp. paracasei SM20, SM29, and SM63 and molecular typing of the strains. *Journal of Food Protection*, 68(1), 111-119.

Scrimshaw, N. S., & Murrari, E. B. (1988). The acceptability of milk and milk products in populations with a high prevalence of lactose intolerance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 48(SUPPL.), 1083-1159.

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. (2002) Sanidad avícola. Resolución 882/2002. Créase el "Programa de Control de las Micoplasmosis y Salmonelosis de las Aves y Prevención y Vigilancia de Enfermedades Exóticas y de Alto Riesgo en planteles de reproducción".

Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4), 405-440.

Shah, D. H., Zhou, X., Addwebi, T., Davis, M. A., Orfe, L., Call, D. R., et al. (2011). Cell invasion of poultry-associated salmonella enterica serovar enteritidis isolates is associated with pathogenicity, motility and proteins secreted by the type III secretion system. *Microbiology*, 157(5), 1428-1445.

Shamoto, K., & Yamauchi, K. (2000). Recovery responses of chick intestinal villus morphology to different refeeding procedures. *Poultry Science*, 79(5), 718-723.

Shiomi, M., Sasaki, K., Murofushi, M., & Aibara, K. (1982). Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 35(2), 75-80.

Shivaprasad, H. L. (2000). Fowl typhoid and pullorum disease. *OIE Revue Scientifique Et Technique*, 19(2), 405-424.

Shivaprashad, H. L. (1997). Pullorum disease and fowl typhoid. In *Diseases of Poultry*, 10th ed.; Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., McDoughald, L.R., Saif, Y.M., Eds.; Iowa State University press: Ames, IA, USA, pp. 82-96.

Silva, K. R., Rodrigues, S. A., Filho, L. X., & Lima, Á. S. (2009). Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152(2), 316-325.

Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G., & Spasov, Z. (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 1-6.

Simova, E. D., Beshkova, D. M., Angelov, M. P., & Dimitrov, Z. P. (2008). Bacteriocin production by strain *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* BB18 during continuous prefermentation of yogurt starter culture and subsequent batch coagulation of milk. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(6), 559-567.

Sjögren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnürer, J., & Kenne, L. (2003). Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7554-7557.

Skeie, S., Kieronczyk, A., Næss, R. M., & Østlie, H. (2008). *Lactobacillus* adjuncts in cheese: Their influence on the degradation of citrate and serine during ripening of a washed curd cheese. *International Dairy Journal*, 18(2), 158-168.

Smithers, G. W., Ballard, F. J., Copeland, A. D., De Silva, K. J., Dionysius, D. A., Francis, G. L., et al. (1996). New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 79(8), 1454-1459.

Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins-from 'gutter-to-gold'. *International Dairy Journal*, 18(7), 695-704.

Soerjadi, A. S., Snoeyenbos G. H., & Weinack O. M. (1982). Intestinal colonization and competitive exclusion of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in young chicks. *Avian Diseases*, 26, 520–524.

Soerjadi-Liem, A. S., Snoeyenbos, G. H., Weinack O. M. (1984). Comparative studies on competitive exclusion of three isolates of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in chickens by native gut microflora. *Avian Diseases*, 28, 139-146.

Soncini R. (2011). Alternativas para reducir riesgos de infección por salmonelas en planteles de aves. Artículo publicado en el libro de actas del XXII Latin American Poultry Congress, Buenos Aires, Argentina. Disponible en: <http://www.engormix.com/MA-avicultura/manejo/articulos/salmonella-en-aves-t3646/124-p0.htm>, consultado el 6 de diciembre de 2011.

Sousa Jr., R., Lopes, G. P., Pinto, G. A., Almeida, P. I. F., & Giordano, R. C. (2004). GMC-fuzzy control of pH during enzymatic hydrolysis of cheese whey proteins. *Computers and Chemical Engineering*, 28(9), 1661-1672.

Southgate, D. A. (1991). Selected methods. In Determination of food carbohydrates. 99-144. Essex, UK: Applied Science Publishers Ltd.

Sterzo, E. V., Paiva, J. B., Mesquita, A. L., Freitas Neto, O. C., & Berchieri Jr., A. (2007). Organic acids and/or compound with defined microorganisms to control salmonella enterica serovar enteritidis experimental infection in chickens. *Revista Brasileira De Ciencia Avicola*, 9(1), 69-73.

St-Onge, M. P., Farnworth, E. R., Savard, T., Chabot, D., Mafu, A., & Jones, P. J. H. (2002). Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: A randomized controlled trial. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, art. N° 1.

Stratford, M., & Anslow, P. A. (1996). Comparison of the inhibitory action on *saccharomyces cerevisiae* of weak- acid preservatives, uncouplers, and medium-chain fatty acids. *FEMS Microbiology Letters*, 142(1), 53-58.

Stratford, M., Plumridge, A., Nebe-von-Caron, G., & Archer, D. B. (2009). Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. *International Journal of Food Microbiology*, 136(1), 37-43



- Ström, K., Sjögren, J., Broberg, A., & Schnürer, J. (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-phe-L-pro) and cyclo(L-phe-trans-4-OH-L-pro) and 3-phenyllactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4322-4327.
- Ström, K. (2005). Tesis Doctoral: Fungal Inhibitory Lactic Acid Bacteria: Characterization and Application of *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Süha Yalçın, A. (2006). Emerging therapeutic potential of whey proteins and peptides. *Current Pharmaceutical Design*, 12(13), 1637-1643.
- Suzuki, M. T., & Giovannoni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 625-630.
- Taing, O., & Taing, K. (2007). Production of malic and succinic acids by sugar-tolerant yeast *zygosaccharomyces rouxii*. *European Food Research and Technology*, 224(3), 343-347.
- Takizawa, S., Kojima, S., Tamura, S., Fujinaga, S., Benno, Y., & Nakase, T. (1994). *Lactobacillus kefirgranum* sp. nov. and *lactobacillus parakefir* sp. nov., two new species from kefir grains. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(3), 435-439.
- Tannock, G. W. (2004). A special fondness for lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3189-3194.
- Telg, B. E., & Caldwell, D. J. (2009). Efficacy testing of a defined competitive exclusion product in combination with fructooligosaccharide for protection against salmonella typhimurium challenge in broiler chicks. *Journal of Applied Poultry Research*, 18(3), 521-529.
- Tellez, G., Dean, C. E., Corrier, D. E., Deloach, J. R., Jaeger, L., & Hargis, B. M. (1993). Effect of dietary lactose on cecal morphology, pH, organic acids, and salmonella enteritidis organ invasion in leghorn chicks. *Poultry Science*, 72(4), 636-642.
- Tellez, G., Pixley, C., Wolfenden, R. E., Layton, S. L., & Hargis, B. M. (2011). Probiotics/direct fed microbials for salmonella control in poultry. *Food Research International*. Article in press doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071.
- Teo, A. Y., & Tan, H. (2007). Evaluation of the performance and intestinal gut microflora of broilers fed on corn-soy diets supplemented with bacillus subtilis PB6 (CloSTAT). *Journal of Applied Poultry Research*, 16(3), 296-303.

- Timmerman, H. M., Koning, C. J. M., Mulder, L., Rombouts, F. M., & Beynell, A. C. (2004). Monostrain, multistain and multispecies probiotics—a comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology* 96, 219–233.
- Timmerman, H. M., Veldman, A., Van Den Elsen, E., Rombouts, F. M., & Beynen, A. C. (2006). Mortality and growth performance of broilers given drinking water supplemented with chicken-specific probiotics. *Poultry Science*, 85(8), 1383-1388.
- Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 5987-6000.
- Tollefson, L., Altekruze, S. F., & Potter, M. E. (1997). Therapeutic antibiotics in animal feeds and antibiotic resistance. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, 16(2), 709-715.
- Torok, V. A., Ophel-Keller, K., Loo, M., & Hughes, R. J. (2008). Application of methods for identifying broiler chicken gut bacterial species linked with increased energy metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3), 783-791.
- Tsai, C., Hsih, H., Chiu, H., Lai, Y., Liu, J., Yu, B. (2005). Antagonistic activity against salmonella infection in vitro and in vivo for two lactobacillus strains from swine and poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 102(2), 185-194.
- Tuomola, E. M., & Salminen, S. J. (1998). Adhesion of some probiotic and dairy lactobacillus strains to caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 41(1), 45-51.
- Urdaneta, E., Barrenetxe, J., Aranguren, P., Irigoyen, A., Marzo, F., & Ibáñez, F. C. (2007). Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats. *Nutrition Research*, 27(10), 653-658.
- Uzzau, S., Brown, D. J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., et al. (2000). Host adapted serotypes of salmonella enterica. *Epidemiology and Infection*, 125(2), 229-255.
- Valdez, Y., Ferreira, R. B. R., & Finlay, B. B. (2009). Molecular mechanisms of salmonella virulence and host resistance. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 337(1), 93-127.
- Valerio, F., De Bellis, P., Lonigro, S. L., Visconti, A., & Lavermicocca, P. (2008). Use of lactobacillus plantarum fermentation products in bread-making to prevent bacillus subtilis ropy spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 122(3), 328-332.

- Van der Aa Kühle, A., Skovgaard, K., & Jespersen, L. (2005). In vitro screening of probiotic properties of *saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology*, *101*(1), 29-39.
- Van Der Wielen, P. W. J. J., Keuzenkamp, D. A., Lipman, L. J. A., Van Knapen, F., & Biesterveld, S. (2002). Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. *Microbial Ecology*, *44*(3), 286-293.
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Velge, P., Bottreau, E., Fievez, V., et al. (2003). Invasion of salmonella enteritidis in avian intestinal epithelial cells in vitro is influenced by short-chain fatty acids. *International Journal of Food Microbiology*, *85*(3), 237-248.
- Van Immerseel, F., Fievez, V., De Buck, J., Pasmans, F., Martel, A., Haesebrouck, F., et al. (2004). Microencapsulated short-chain fatty acids in feed modify colonization and invasion early after infection with salmonella enteritidis in young chickens. *Poultry Science*, *83*(1), 69-74.
- Van Immerseel, F., Boyen, F., Gantois, I., Timbermont, L., Bohez, L., Pasmans, F., et al. (2005). Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of salmonella in poultry. *Poultry Science*, *84*(12), 1851-1856.
- Van Immerseel, F., Russell, J. B., Flythe, M. D., Gantois, I., Timbermont, L., Pasmans, F., et al. (2006). The use of organic acids to combat salmonella in poultry: A mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathology*, *35*(3), 182-188.
- Vásquez M., S. M., Suárez M., H., & Zapata B., S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena De Nutricion*, *36*(1), 64-71.
- Vega, C., & Roos, Y. H. (2006). Invited review: Spray-dried dairy and dairy-like emulsions - compositional considerations. *Journal of Dairy Science*, *89*(2), 383-401.
- Velge, P., Cloeckart, A., & Barrow, P. (2005). Emergence of salmonella epidemics: The problems related to salmonella enterica serotype enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Veterinary Research*, *36*(3), 267-288.
- Vicente, J. L., Higgins, S. E., Hargis, B. M., & Tellez, G. (2007). Effect of poultry guard litter amendment on horizontal transmission of salmonella enteritidis in broiler chicks. *International Journal of Poultry Science*, *6*(5), 314-317.

- Vilà, B., Fontgibell, A., Badiola, I., Esteve-Garcia, E., Jiménez, G., Castillo, M., et al. (2009). Reduction of salmonella enterica var. enteritidis colonization and invasion by bacillus cereus var. toyoi inclusion in poultry feeds. *Poultry Science*, 88(5), 975-979.
- Vilagravel, B., Esteve-Garcia, E., & Brufau, J. (2010). Probiotic micro-organisms: 100 years of innovation and efficacy; modes of action. *World's Poultry Science Journal*, 66(3), 369-380.
- Vinderola, C. G., Duarte, J., Thangavel, D., Perdigón, G., Farnworth, E., & Matar, C. (2005). Immunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research*, 72(2), 195-202.
- Vinderola, G., Perdigón, G., Duarte, J., Farnworth, E., & Matar, C. (2006a). Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by lactobacillus kefirianofaciens on the gut mucosal immunity. *Cytokine*, 36(5-6), 254-260.
- Vinderola, G., Perdigón, G., Duarte, J., Farnworth, E., & Matar, C. (2006b). Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation. *Journal of Dairy Research*, 73(4), 472-479.
- Vinderola, G., Perdigon, G., Duarte, J., Thangavel, D., Farnworth, E., & Matar, C. (2006c). Effects of kefir fractions on innate immunity. *Immunobiology*, 211(3), 149-156.
- Vujicic, I. F., Vulic, M., & Konyves, T. (1992). Assimilation of cholesterol in milk by kefir cultures. *Biotechnology Letters*, 14(9), 847-850.
- Wagner, R. D., Holland, M., & Cerniglia, C. E. (2002). An in vitro assay to evaluate competitive exclusion products for poultry. *Journal of Food Protection*, 65(5), 746-751.
- Wales, A. D., Carrique-Mas, J. J., Rankin, M., Bell, B., Thind, B. B., & Davies, R. H. (2010). Review of the carriage of zoonotic bacteria by arthropods, with special reference to salmonella in mites, flies and litter beetles. *Zoonoses and Public Health*, 57(5), 299-314.
- Walter, J., Hertel, C., Tannock, G. W., Lis, C. M., Munro, K., & Hammes, W. P. (2001). Detection of lactobacillus, pediococcus, leuconostoc, and weissella species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2578-2585.
- Wang, S. Y., Chen, H. C., Liu, J. R., Lin, Y. C., & Chen, M. J. (2008). Identification of yeasts and evaluation of their distribution in taiwanese kefir and viili starters. *Journal of Dairy Science*, 91(10), 3798-3805.

Weaver Jr., W. D., & Meijerhof, R. (1991). The effect of different levels of relative humidity and air movement on litter conditions, ammonia levels, growth, and carcass quality for broiler chickens. *Poultry Science*, 70(4), 746-755.

Wiard, T., Gockley, M., Parrott, T., Troyer, G. and Rehberger, T. (2001) The Effect of a Biological Litter Treatment on Salmonella sp. Prevalence in Turkey Breeder Flock Litter. Joint Meeting of ADSA, AMSA, ASAS and PSA, Indianapolis, IN [http://www.agtechproducts.com/productsupport/Breeder\\_flock\\_trial-Salmonella\\_Report.pdf](http://www.agtechproducts.com/productsupport/Breeder_flock_trial-Salmonella_Report.pdf) (acceso en 21 December 2008).

Wierup, M., Wold-Troell, M., Nurmi, E., & Häkkinen, M. (1988). Epidemiological evaluation of the salmonella-controlling effect of a nationwide use of a competitive exclusion culture in poultry. *Poultry Science*, 67(7), 1026-1033.

Wierup, M., Wahlstrom, H., & Engstrom, B. (1992). Experience of a 10-year use of competitive exclusion treatment as part of the salmonella control programme in sweden. *International Journal of Food Microbiology*, 15(3-4), 287-291.

Witthuhn, R. C., Schoeman, T., & Britz, T. J. (2004). Isolation and characterization of the microbial population of different south african kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*, 57(1), 33-37.

Witthuhn, R. C., Schoeman, T., & Britz, T. J. (2005). Characterisation of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal*, 15(4), 383-389.

Wójtowski, J., Danków, R., Skrzypek, R., & Fahr, R. (2003). The fatty acid profile in kefirs from sheep, goat and cow milk. *Milchwissenschaft*, 58(11-12), 633-636.

- Wu, Z., & Bai, F. (2005). *Kazachstania aquatica* sp. nov. and *kazachstania solicola* sp. nov., novel ascomycetous yeast species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 2219-2224.
- Wu, L. Y., Tan, R. B., & Shi, K. J. (2008). Effect of a dried *Bacillus subtilis* culture on gosling growth performance. *British Poultry Science*, 49(4), 418-422.
- Wyder, M., Spillmann, H., & Puhan, Z. (1997). Investigation of the yeast flora in dairy products: A case study of kefir. *Food Technology and Biotechnology*, 35(4), 299-304.
- Wyder, M., Meile, L., & Teuber, M. (1999). Description of *saccharomyces turicensis* sp. nov., a new species from kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, 22(3), 420-425.
- Xie, N., Zhou, T., & Li, B. (2012). Kefir yeasts enhance probiotic potentials of *Lactobacillus paracasei* H9: The positive effects of coaggregation between the two strains. *Food Research International*, 45(1), 394-401.
- Yaman, H., Ulukanli, Z., Elmali, M., & Unal, Y. (2006). The effect of a fermented probiotic, the kefir, on intestinal flora of poultry domesticated geese (*Anser anser*). *Revue De Medecine Veterinaire*, 157(7), 379-386.
- Yang, S. T., & Silva, E. M. (1995). Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. *Journal of Dairy Science*, 78(11), 2541-2562.
- Yasar, S., & Forbes, J. M. (1999). Performance and gastro-intestinal response of broiler chickens fed on cereal grain-based foods soaked in water. *British Poultry Science*, 40(1), 65-76.
- Yegani, M., & Korver, D. R. (2008). Factors affecting intestinal health in poultry. *Poultry Science*, 87(10), 2052-2063.
- Yeo, J., & Kim, K. (1997). Effect of feeding diets containing an antibiotic, a probiotic, or yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks. *Poultry Science*, 76(2), 381-385.
- Yim, L., Betancor, L., Martinez, A., Giossa, G., Bryant, C., Maskell, D., & Chabalgoity, J. A. (2010). Differential phenotypic diversity among epidemic-spanning *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates from humans or animals. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(20), 6812-6820.

- Yin, Y., Lei, F., Zhu, L., Li, S., Wu, Z., Zhang, R., et al. (2010). Exposure of different bacterial inocula to newborn chicken affects gut microbiota development and ileum gene expression. *ISME Journal*, 4(3), 367-376.
- Yoon, Y. H., Cho, J. K., Baek, Y. J., & Huh, C.S. (1999). Antimutagenic activity of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and yoghurt and non-starter strains. *Korean Journal of Animal Science* (in Korean, abstract only) 41, 39-44.
- Yoshida, T., & Toyoshima, K. (1994). Lactic acid bacteria and yeast from kefir. *Japan Society of Nutrition and Food Science*, 47, 55-59.
- Yoshida, Y., Yokoi, W., Ohishi, K., Ito, M., Naito, E., & Sawada, H. (2005). Effects of the cell wall of *kluyveromyces marxianus* YIT 8292 on the plasma cholesterol and fecal sterol excretion in rats fed on a high-cholesterol diet. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69(4), 714-723.
- Yu, Q., Wang, Z., & Yang, Q. (2011). Ability of *Lactobacillus* to inhibit enteric pathogenic bacteria adhesion on caco-2 cells. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(4), 881-886.
- Yüksekdağ, Z. N., Beyatlı, Y., & Aslım, B. (2004). Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *LWT - Food Science and Technology*, 37(6), 663-667.
- Zacconi, C., Parisi, M.G., Sarra, P.G., Dallavalle, P. (1995). Competitive exclusion of *Salmonella kedougou* in kefir fed chicks. *Microbiologie, Aliments, Nutrition* 12, 387-390.
- Zacconi, C., Scolari, G., Vescovo, M., & Sarra, P. G. (2003). Competitive exclusion of *Campylobacter jejuni* by kefir fermented milk. *Annals of Microbiology*, 53(2), 179-187.
- Zajšek, K., & Goršek, A. (2010). Mathematical modelling of ethanol production by mixed kefir grains yeast population as a function of temperature variations. *Biochemical Engineering Journal*, 49(1), 7-12.
- Zbinden, R., Gönczi, E. E., & Altwegg, M. (1999). Inhibition of *Saccharomyces boulardii* (nom. inval.) on cell invasion of *Salmonella typhimurium* and *Yersinia enterocolitica*. *Microbial Ecology in Health and Disease* 11(3), 158-162.
- Zelle, R. M., De Hulster, E., Van Winden, W. A., De Waard, P., Dijkema, C., Winkler, A. A., et al. (2008). Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*: Engineering of pyruvate

carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(9), 2766-2777.

Zhou, J., Liu, X., Jiang, H., & Dong, M. (2009). Analysis of the microflora in tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*, 26(8), 770-775.

Zotta, T., Ricciardi, A., Ciocia, F., Rossano, R., & Parente, E. (2008). Diversity of stress responses in dairy thermophilic streptococci. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1), 34-42.