



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

**Estudio del potencial del kefir como agente
antifúngico**

Mic. Raúl Ricardo Gamba

Directora: Dra. Graciela Liliana De Antoni

Año 2015

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Graciela De Antoni por recibirme en su grupo, por su acompañamiento y enseñanza invaluable durante estos años.

A Gela por su asesoría, su sincera amistad y paciencia (特に私はしつこい人になった時).

A mi familia, por supuesto, por todo...

A la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP.

Al CIDCA (Centro de Estudios en Criotecnología y Preservación de Alimentos).

A CONICET, por el financiamiento para llevar a cabo mi trabajo de tesis.

A Andrea Astoreca y Teresa Alconada, por su colaboración y apoyo.

Al grupo de secado del CIDCA, a Sergio Ginner, Sivina Demarchi, Natalia Quinteros y Martin Torres por su excelente predisposición y amabilidad.

A Ana Clara por su asesoría y amabilidad.

A la cátedra de Toxicología y los Dr. Darío Andrinolo y Daniela Sedán por su apoyo en las determinaciones por HPLC.

A los compañeros de la Cátedra de Microbiología de la FCE.

A los compañeros del CIDCA.

A Jessica Minnard, Ivana Rolny, Paula Carasi, Maria Serradel, Esteban Gerbino, Fernanda Hamet, Marina Golowczyc, Fernando Trejo y Pablo Pérez por su enseñanza y apoyo constantes.

A Gabriela Diosma por su amabilidad y apoyo en el camino.

A Mariana Correa, Anita Moretti, Lina Merino, Candela Moure, Carolina Ni Coló, Jorge Puppo y Mariángeles Carrá, que me han acompañado en la experimentación y pensamiento de esta tesis.

A Robert, por su mano extendida siempre llena de energía y apoyo.

A chicho por fomentar la recreación, y a Lucre y Deme por ponerlo en orden y por su paciencia.

A Jorge, Hector y MaFer, por su paciencia.

Índice

1	Introducción General	1
1.1	Hongos filamentosos y micotoxinas de los alimentos.	1
1.2	Mecanismo de acción de las aflatoxinas	5
1.3	Contaminación por hongos y micotoxinas en alimentos para crianza de aves	8
1.4	Técnicas de control fúngico en alimentos	11
1.4.1	Aplicación de ácidos orgánicos puros en el control del desarrollo fúngico	13
1.4.2	Actividad antifúngica de las Bacterias Ácido Lácticas (BAL)	15
1.5	El Kefir	17
1.6	Estudios sobre protección de líneas celulares por BAL en presencia de micotoxinas.	20
1.7	Permeado de suero como sustrato de la fermentación.	20
1.8	Justificación del estudio.	21
2	Objetivos e Hipótesis	23
3	Materiales y Métodos	25
3.1	Especies fúngicas empleadas	25
3.2	Microorganismos aislados de gránulos de Kefir (MK).	25
3.3	Gránulos de Kefir.	25
3.4	Medios de cultivo y soluciones.	26
3.5	Curvas de acidificación con gránulos de kefir o MK.	26
3.6	Obtención de los microorganismos de los productos fermentados con gránulos de kefir y con MK.	27
3.7	Preparación del inóculo de conidios.	27
3.8	Obtención de sobrenadantes libres de células (SLC) de permeado de suero fermentado con gránulos CIDCA AGK1 (PSFG).	27
3.9	Determinación de Lactosa en PS.	28
3.10	Determinación de Nitrógeno total en PS.	28
3.11	Determinación de cenizas totales en PS.	29
3.12	Ensayos de inhibición fúngica.	29
3.12.1	Estudio del Porcentaje de Inhibición de la germinación de los conidios.	29
3.12.2	Estudio de inhibición fúngica en placa por difusión.	30
	- Inhibición en placa por difusión con SLC de PSFG.	30
	- Inhibición en placa por difusión con ácidos láctico y acético puros.	31
	- Parámetros de crecimiento	31
	• Determinación de la cinética de crecimiento fúngico.	31
	• Cálculo de la tasa de crecimiento (K_D) (mm/h).	31
	• Cálculo de fase de latencia (Lag) (h).	32
	• Cálculo del índice de inhibición de la tasa de crecimiento ($\%I K_D$) y relación fase de latencia del tratamiento/fase de latencia control (LagT/LagC).	32
3.12.3	Determinación de la concentración fungicida mínima (CFM)	32

3.12.4	Determinación de la concentración fungicida mínima (CFM) con ácidos láctico y acético puros.	33
3.12.5	Determinación de la concentración fungicida mínima (CFM) con mezclas de ácidos láctico y acético.	34
3.13	Análisis por HPLC de los ácidos láctico y acético en los SLC y en los alimentos adicionados de productos fermentados.	35
3.14	Cálculo de la concentración de ácidos orgánicos no disociados.	35
3.15	Cálculo de la concentración inhibitoria fraccionaria (CIF).	35
3.16	Preparación de PS acidificados artificialmente con ácidos orgánicos puros (láctico y acético) y con HCl	36
3.17	Alimento para pollos	37
3.18	Adición al alimento para pollos de PSFG.	37
3.18.1	Resistencia del alimento adicionado de PSFG a la contaminación artificial.	37
3.19	Determinación de la producción de micotoxinas.	38
3.20	Extracción de aflatoxina B ₁ para realizar cuantificación mediante HPLC.	39
3.21	Cuantificación de aflatoxina B ₁	40
3.22	Determinación de la concentración de aflatoxina B ₁ mediante método inmunológico (VERATOX)	40
3.23	Captura de aflatoxina B ₁ por microorganismos totales del granulo de kefir CIDCA AGK1 y con microorganismos aislados del granulo de kefir.	41
3.23.1	Preparación de la solución de aflatoxina B ₁ .	41
	a) Preparación de la solución madre y la solución de trabajo de aflatoxina.	41
	b) Determinación de la concentración de aflatoxinas.	42
3.23.2	Preparación de los microorganismos para los experimentos de captura de aflatoxina B ₁ .	43
	a) Conjunto de microorganismos totales del gránulo de kefir.	43
	b) Microorganismos Aislados del gránulo de kefir.	43
3.23.3	Captura de aflatoxina B ₁ por microorganismos aislados del kefir y microorganismos totales del gránulo CIDCA AGK1.	44
3.23.4	Recuento de los microorganismos empleados en los estudios de captura de aflatoxina B ₁ .	45
3.23.5	Determinación de la concentración de aflatoxina B ₁ en el sobrenadante (SN) del desafío, mediante HPLC.	45
3.24	Estudio del efecto citotóxico de la aflatoxina B ₁ en las líneas celulares HepG2 y Caco-2TC7.	46
3.24.1	Descongelación de células almacenadas en nitrógeno líquido.	46
3.24.2	Inoculación de células adherentes HepG2 y Caco-2TC7.	47
4.24.3	Construcción de la curva de calibración.	48
3.24.4	Evaluación del efecto citotóxico de la aflatoxina B ₁ sobre las células HepG2 y Caco-2TC7 mediante ensayo MTT.	49
3.24.5	Tinción con Ioduro de propidio	50
3.24.6	Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa	50
3.24.7	Ensayos de adhesión en células Caco-2TC7.	51
3.24.8	Efecto protector de los microorganismos del kefir sobre las células en presencia de aflatoxina B ₁ .	52

	- Co-incubación previa de los microorganismos del kefir con aflatoxina B ₁ .	52
	- Adición simultánea de los microorganismos del kefir y aflatoxina B ₁ sobre la monocapa celular Caco-2TC7.	52
	- Efecto protector de los microorganismos totales del kefir adheridos sobre una monocapa celular Caco-2TC7.	52
3.25	Análisis estadístico	52
4	Resultados y Discusión	53
4.1	Estudio de la capacidad de crecimiento de los microorganismos del kefir en permeado de suero (PS).	53
4.1.1	Estudio de la cinética de fermentación del PS con microorganismos aislados del kefir y con gránulo de kefir CIDCA AGK1.	54
4.1.2	Determinación del cambio de biomasa del gránulo CIDCA AGK1 en PS.	60
4.1.3	Determinación de la capacidad antifúngica de los productos fermentados con gránulo CIDCA AGK1 en PS.	65
4.1.4	Conclusiones	66
4.2	Estudio de la capacidad inhibitoria de los sobrenadantes de kefir sobre <i>F. graminearum</i> .	67
4.2.1	Optimización del medio de crecimiento de <i>F. graminearum</i>	68
4.2.2	Efecto de los sobrenadantes libres de células de permeado de suero fermentado con gránulos de kefir (SLC PSFG) sobre la germinación de diferentes cepas de <i>F. graminearum</i>	72
4.2.3	Evaluación de la actividad fungicida o fungistática de los SLC PSFG.	76
4.2.4	Efecto de los SLC PSFG sobre los parámetros de crecimiento de <i>F. graminearum</i> en medio sólido.	78
4.2.5	Evaluación de la actividad fungicida o fungistática de los SLC PSFG.	86
4.2.6	Comparación entre resultados obtenidos mediante los ensayos de reducción de la germinación y los ensayos de inhibición en placa.	86
4.2.7	Efecto de los ácidos láctico y acético puros y sus mezclas sobre <i>F. graminearum</i>	88
4.2.7	a) Efecto de los ácidos láctico y acético puros y sus mezclas sobre la reducción de la germinación de <i>F. graminearum</i>	88
4.2.7	b) Efecto de los ácidos láctico y acético puros y sus mezclas sobre los parámetros de crecimiento de <i>F. graminearum</i>	96
4.2.8	Efecto de los SLC PSFG sobre la producción de zearalenona de <i>F. graminearum</i>	102
4.2.9	Conclusiones	108
4.3	Estudio de la capacidad inhibitoria del permeado de suero fermentado con gránulos de kefir sobre <i>A. parasiticus</i> CMUNLP7.	109
4.3.1	Determinación de la capacidad inhibitoria de los SLC PSFG sobre <i>A. parasiticus</i> CMUNLP7.	110
4.3.2	Determinación del efecto fungicida del PSFG.	114
4.3.3	Cálculo de parámetros cinéticos.	115
4.3.4	Determinación de la producción de aflatoxinas por <i>A. parasiticus</i> CMUNLP7 desafiado con distintas concentraciones de SLC PSFG en medio sólido.	123
4.3.5	Efecto de los ácidos láctico y acético individuales sobre el crecimiento de <i>A. parasiticus</i> CMUNLP7 en medio sólido.	126

4.3.6	Efecto de soluciones mezcla de ácidos orgánicos, sobre el crecimiento de <i>A. parasiticus</i> CMUNLP7 en medio sólido.	127
4.3.7	Efecto antifúngico y sobre la producción de aflatoxinas de la adición de PSFG a alimento para pollos.	138
4.3.8	Conclusiones	146
4.4	Interacción de los microorganismos del kefir con aflatoxina B ₁ .	147
4.4.1	Determinación de la capacidad de captura de aflatoxina B ₁ por el conjunto de microorganismos presentes en Permeado de Suero (PS) fermentado con gránulos de kefir CIDCA AGK1.	149
4.4.2	Determinación de la capacidad de captura de aflatoxina B ₁ por microorganismos aislados del gránulo de kefir.	152
4.4.2.1	Captura de aflatoxina B ₁ por lactobacilos.	152
4.4.2.2	Captura de aflatoxina B ₁ por parte de levaduras.	155
4.4.3	Estudio de la influencia del porcentaje de hidrofobicidad superficial en la captura de aflatoxina B ₁ .	159
4.4.4	Captura de aflatoxina B ₁ en presencia de microorganismos viables y no viables.	166
4.4.5	Determinación de la capacidad de captura de aflatoxina B ₁ por microorganismos totales del gránulo de kefir CIDCA AGK1, <i>L. plantarum</i> CIDCA 83114 y <i>K. marxianus</i> CIDCA 8154 en solución salina a diferentes pH.	168
4.4.6	Capacidad de captura de aflatoxina B ₁ con diferentes concentraciones de <i>L. plantarum</i> CIDCA 83114 y <i>K. marxianus</i> CIDCA 8154 y de los microorganismos totales del kefir.	174
4.4.7	Estudio de la capacidad protectora del kefir sobre monocapas celulares expuestas a aflatoxina B ₁ .	176
4.4.7.1	Capacidad de adhesión de los microorganismos del kefir a las células Caco-2TC7.	176
4.4.7.2	Estudio del efecto protector de los microorganismos totales del kefir en línea celular Caco-2TC7 expuesta a aflatoxina B ₁ .	178
4.4.7.3	Efecto en el daño celular por la co-incubación de los microorganismos con aflatoxina B ₁ sobre células Caco-2TC7.	180
4.4.7.4	Efecto en el daño celular por la co-incubación de aflatoxina B ₁ con las células HepG2.	181
4.4.7.5	Efecto en el daño celular por la co-incubación de los microorganismos del kefir con las células HepG2.	185
4.4.7.6	Estudio del efecto protector de los microorganismos totales del kefir en línea celular HepG2 expuesta a aflatoxina B ₁ .	188
4.4.7.7	Comparación entre células HepG2 y Caco-2TC7.	190
4.4.8	Conclusiones	190
5	Conclusiones Generales	192
6	Referencias bibliográficas	199
	Anexo	

Índice de Tablas

3.1	Concentraciones de ácidos láctico y acético utilizados en los ensayos de inhibición sobre <i>F. graminearum</i> y <i>A. parasiticus</i> CMUNLP7.	33
3.2	Mezclas de ácidos láctico y acético utilizados en los ensayos de inhibición fúngica realizados sobre <i>F. graminearum</i> (Fg44, Fg36 y Fg48) y <i>A. parasiticus</i> CMUNLP7.	34
3.3	Absorbancia y ϵ obtenidos para las tres concentraciones de $K_2Cr_2O_7$.	42
3.4	Concentraciones teóricas de aflatoxina B ₁ y área obtenida en la corrida de HPLC.	43
4.1.1	Contenido de nitrógeno, lactosa, cenizas y pH del PS resuspendido al 5%.	54
4.1.2	Recuentos de lactobacilos, levadura y gránulos de kefir CIDCA AGK1 desarrollados en PS, leche o MRS.	58
4.1.3	Valores de referencia para los recuentos de BAL y levaduras.	63
4.2.1	Optimización del medio de cultivo para crecimiento y esporulación de <i>F. graminearum</i> mediante recuento en cámara de Neubauer.	69
4.2.2	Optimización de la esporulación <i>F. graminearum</i> en medio SNA mediante recuento en cámara de Neubauer.	71
4.2.3	Porcentajes de inhibición de la germinación de <i>F. graminearum</i> con SLC PSFG.	74
4.2.4	Crecimiento de <i>F. graminearum</i> en agar MEA luego de la exposición a SLC PSFG en ensayo de reducción de la germinación.	77
4.2.5	Concentración de ácidos no disociados totales y pH de las placas de MEA suplementadas o no con SLC PSFG.	84
4.2.6	Comparación entre ensayo de de reducción de la germinación y el ensayo de inhibición en placa.	87
4.2.7	Inhibición de la germinación de <i>F. graminearum</i> con distintas concentraciones de ácido acético y láctico.	89
4.2.8	Crecimiento de <i>F. graminearum</i> en agar MEA luego de la exposición a un medio con ácidos láctico o acético en ensayo de reducción de la germinación.	91
4.2.9	CFM de ácido láctico y acético sobre <i>F. graminearum</i>	92
4.2.10	Mezclas de ácidos láctico y acético a probar en ensayo de inhibición de la germinación sobre <i>F. graminearum</i> .	93
4.2.11	Determinación de la CFM de los ácidos láctico y acético sobre <i>F. graminearum</i>	98
4.3.1	Concentración de Ácido láctico y Acético en SLC PSFG y PS acidificados artificialmente.	112
4.3.2	Parámetros cinéticos y concentraciones de ácidos no disociados en la inhibición de <i>A. parasiticus</i> CMUNLP7 con PSFG con gránulo de kefir CIDCA AGK1.	118
4.3.3	Concentración de AFB1 obtenida en los cultivos de <i>A. parasiticus</i> CMUNLP7 desafiados con distintas concentraciones de SLC PSFG.	123
4.3.4	pH final en el medio de cultivo de las mezclas de ácidos láctico y	128

	acético puros.	
4.3.5	Parámetros cinéticos del crecimiento de <i>A. parasiticus</i> CMUNLP7 en presencia de mezclas de ácidos Láctico y Acético puros.	130
4.3.6	a_w y tiempo de secado del alimento para pollos adicionado de PSFG.	140
4.3.7	Resistencia a la contaminación artificial del alimento para pollos adicionado con PSFG.	141
4.3.8	Concentración de aflatoxina B ₁ en el alimento para pollos contaminado artificialmente con <i>A. parasiticus</i> CMUNLP7.	144
4.3.9	Evolución de los microorganismos del kefir y de los hongos filamentosos naturales del alimento para pollos adicionado con PSFG (1:1) durante 30 días de almacenamiento a 20°C.	145
4.4.1	Porcentaje de captura de los microorganismos totales del kefir cultivados en PS resuspendido al 5%.	149
4.4.2	Porcentaje de captura de AFB1 por los microorganismos totales del kefir cultivados en distintos PS resuspendidos al 5%.	151
4.4.3	Porcentajes de captura de aflatoxina B ₁ por lactobacilos aislados de gránulos de kefir.	153
4.4.4	Porcentajes de captura de aflatoxina B ₁ por levaduras aisladas del kefir y de otros productos lácteos fermentados.	156
4.4.5	Porcentaje de captura de aflatoxina B ₁ por microorganismo y porcentaje de Hidrofobicidad de lactobacilos aislados del kefir.	161
4.4.6	Porcentaje de captura de aflatoxina B ₁ por microorganismo y porcentaje de Hidrofobicidad de levaduras aisladas del kefir.	164
4.4.7	Recuentos de los microorganismos después del desafío con aflatoxina B ₁ a diferentes valores de pH.	172
4.4.8	Estudio de adhesión de los microorganismos del kefir a las Caco-2TC7.	177
4.4.9	Actividad LDH de células Caco-2TC7 expuestas a aflatoxina B ₁ con o sin presencia de microorganismos totales del kefir.	180
4.4.10	Actividad deshidrogenasa mitocondrial, pH y DO _{600NM} de las células HepG2 incubadas con microorganismos totales del kefir.	187

Índice de Figuras

1.1	Mecanismo de acción de las aflatoxinas.	5
3.1	Esquema experimental del ensayo de resistencia del alimento adicionado de PSFG a la contaminación artificial. AP: alimento para pollos.	38
3.2	Esquema experimental de la extracción de AFB1 del alimento para pollos.	40
3.3	Regresión lineal de las áreas y concentraciones de aflatoxina AFB1	43
3.4	Etapas de los experimentos de captura de aflatoxina AFB1.	45
4.1.1	Cinéticas de acidificación del PS incubado con lactobacilos aislados del kefir (a), levaduras aisladas del kefir (b) y gránulos de kefir CIDCA AGK1 (c).	55
4.1.2	Cinética de acidificación de gránulo de kefir CIDCA AGK1 con	59

	distintos tiempos de adaptación en PS.	
4.1.3	Figura 4.1.3. Cinética de acidificación de gránulo de kefir CIDCA AGK1 cultivados en PS sin adaptación previa al PS y de gránulos cultivados en leche.	60
4.1.4	Cambio de biomasa del gránulo de kefir CIDCA AGK1 cultivados en leche (a) y con distintos tiempos de adaptación en PS (b).	61
4.1.5	Gránulos de kefir CIDCA AGK1 crecidos en leche y en PS.	64
4.1.6	Porcentajes de inhibición de la germinación de <i>Aspergillus flavus</i> AFUNL5; <i>Penicillium sumatrense</i> CMUNLP3; <i>P. crustosum</i> CMUNLP4; <i>Fusarium graminearum</i> Fg48 desafiados a SLC PSFG obtenidos a distintos pH finales de fermentación.	66
4.2.1	Comparación entre los recuentos de conidios totales por cámara de Neubauer en función de los conidios viables en placa MEA. Los hongos desarrollados en agar inclinado (a) SNA; (b) PDA y (c) CYA en función del recuento de hongos viables en placas MEA de <i>F. graminearum</i>	70
4.2.2	Comparación entre los recuentos de hongos totales por cámara de Neubauer obtenidos de hongos desarrollados en agar inclinado SNA con ciclos alternados de 12 horas de luz blanca y luz UV en función del recuento de hongos viables en placas MEA de <i>F. graminearum</i>	71
4.2.3	Inhibición de la germinación de <i>F. graminearum</i> con los sobrenadantes libres de células obtenidos por la fermentación del permeado de suero con gránulos de kefir CIDCA AGK1 (SLC PSFG), a 30°C hasta distintos pH, sin diluir.	73
4.2.4	Porcentaje de inhibición de la germinación de <i>F. graminearum</i>	76
4.2.5	Porcentaje de inhibición de la germinación de <i>F. graminearum</i> en función de los ácidos láctico y acético no disociados.	78
4.2.6	Curva de crecimiento de <i>F. graminearum</i> (a) Fg44, (b) Fg36 y (c) Fg48 en medio sólido MEA.	80
4.2.7	Efecto de los SLC PSFG en diferentes concentraciones (v/v) en el medio MEA sobre la velocidad de crecimiento y fase de latencia de <i>F. graminearum</i>	83
4.2.8	Parámetros de crecimiento de <i>F. graminearum</i> en función de la concentración de ácido láctico y acético no disociados. a) IIKD y b) relación LagT/LagC de <i>F. graminearum</i>	85
4.2.9	Placas de MEA inoculadas con <i>F. graminearum</i> Fg36 extraídas del medio MEA con SLC PSFG a pH 3,5 al 70% v/v.	86
4.2.10	Porcentaje de inhibición de la germinación de <i>F. graminearum</i> en función del ácido acético no disociado.	92
4.2.11	Porcentaje de inhibición de la germinación de <i>F. graminearum</i> en función de los ácidos láctico y acético no disociados presentes en las mezclas de ácido láctico y acético.	94
4.2.12	Comparación entre porcentaje de inhibición de la germinación de <i>F. graminearum</i> en función de los ácidos láctico y acético no disociados presentes en las mezclas de ácido láctico y acético con el porcentaje de inhibición de la germinación de <i>F. graminearum</i> desafiados a los diferentes SLC PSFG ensayados.	96
4.2.13	Curva de crecimiento de <i>F. graminearum</i> en medio sólido MEA adicionado con ácido láctico o acético	97

4.2.14	Parámetros de crecimiento de <i>F. graminearum</i> en función de la concentración de ácido láctico y acético no disociados presentes en diferentes mezclas de ácidos láctico y acético en medio sólido.	100
4.2.15	Efecto de los SLC PSFG, obtenidos por la fermentación del permeado de suero con gránulos de kefir CIDCA AGK1, a 30°C sobre la producción de zearalenona en medio sólido	103
4.3.1	Curva de crecimiento de <i>A. parasiticus</i> CMUNLP7 (mm/h) desarrollado en el medio con diferentes tratamientos.	3
4.3.2.	Regresión lineal del crecimiento de <i>A. parasiticus</i> CMUNLP7 en presencia de de medios de cultivo con o sin PSFG.	115
4.3.3	Índices de inhibición fúngica (IK_D y LagT/LagC) en función de concentración de ácidos no disociados totales presentes en los medios adicionados o no con SLC PSFG sobre <i>A. parasiticus</i> CMUNLP7.	121
4.3.4	Regresión lineal del patrón de aflatoxinas del kit VERATOX [®] .	122
4.3.5	Producción de AFB1 por <i>A. parasiticus</i> CMUNLP7 en medio MEA suplementado o no con SLC PSFG en distintas concentraciones determinadas mediante HPLC.	125
4.3.6	Concentración de AFB1 en función de los ácidos no disociados totales presentes en los SLC PSFG.	126
4.3.7	Curvas de crecimiento de <i>A. parasiticus</i> CMUNLP7 en medio MEA con distintas concentraciones de ácido láctico (a) y acético (b).	127
4.3.8	Curva de crecimiento de <i>A. parasiticus</i> CMUNLP7 en presencia de mezclas de ácidos orgánicos puros.	129
4.3.9	Crecimiento de <i>A. parasiticus</i> CMUNLP7 en presencia de diferentes mezclas de ácidos láctico y acético puros.	133
4.3.10	IK_D (a), LagT/LagC (b) y concentración de AFB1 (c) por <i>A. parasiticus</i> CMUNLP7 en función de la Concentración de ácidos no disociados totales presentes en las mezclas de ácidos láctico y acético ensayadas.	137
4.3.11	Aparición visible de <i>A. parasiticus</i> CMUNLP7 en alimento para pollos adicionado con PSFG. Fotografías tomadas después de 4 días del ensayo.	142
4.4.1	Porcentaje de captura de aflatoxina AFB1 por lactobacilo en función del medio de cultivo.	154
4.4.2	Porcentaje de captura de AFB1 por levaduras aisladas de gránulos de kefir y de colección.	157
4.4.3	Comparación entre el porcentaje de captura de AFB1 por microorganismo realizado por cepas de lactobacilos y levaduras aisladas y por los microorganismos totales del kefir.	159
4.4.4	Relación entre el porcentaje de captura AFB1 por microorganismo con el porcentaje de Hidrofobicidad de los lactobacilos evaluados.	163
4.4.5	Relación entre el porcentaje de captura de AFB1 por microorganismo con el porcentaje de Hidrofobicidad de las levaduras evaluadas.	165
4.4.6	Porcentaje de captura (a) y porcentaje de captura por microorganismo (b) de AFB1 por los microorganismos totales del kefir, <i>L. plantarum</i> CIDCA 83114 y <i>K. marxianus</i> CIDCA 8154 viables y no viables por pasteurización.	167

4.4.7	Porcentaje de captura de AFB1 por microorganismos totales del gránulo CIDCA AGK1, <i>L. plantarum</i> CIDCA 83114 y <i>K. marxianus</i> CIDCA 8154, a diferentes valores de pH.	170
4.4.8	Porcentaje de captura de AFB1 por <i>L. plantarum</i> CIDCA 83114, <i>K. marxianus</i> CIDCA 8154 y microorganismos totales del kefir en diferentes concentraciones de microorganismo.	175
4.4.9	Curva de calibración del daño celular en la línea Caco-2TC7 vs. Concentración de AFB1 mediante las técnicas LDH (a) y MTT (b).	179
4.4.10	Determinación de la actividad deshidrogenasa mitocondrial en células HepG2 expuestas a diferentes concentraciones de AFB1 (entre 0 y 500 ppb).	183
4.4.11	Determinación de núcleos necróticos mediante tinción con yoduro de propidio en células HepG2 expuestas a diferentes concentraciones de AFB1 (entre 0 y 500 ppb).	184
4.4.12	Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en células HepG2 expuestas a diferentes concentraciones de AFB1 (entre 0 y 500 ppb).	185
4.4.13	Actividad deshidrogenasa mitocondrial (barras) y LDH (puntos) de células HepG2 expuestas a distintas concentraciones de AFB1 con o sin presencia de microorganismos totales del kefir.	188

Índice de ecuaciones

3.1	Porcentaje de nitrógeno total	28
3.2	Porcentaje de inhibición de la germinación (IG)	30
3.3	Cálculo de Lag	32
3.4	Índice de inhibición de la tasa de crecimiento	32
3.5	Cálculo de la concentración de ácidos orgánicos no disociados.	35
3.6	$CIF_{\text{láctico}}$	35
3.7	$CIF_{\text{acético}}$	36
3.8	$CIF_{\text{índice}}$	36
3.9	Preparación de la solución madre de AFB1	42
3.10	Determinación de la concentración de AFB1	42
3.11	Porcentaje de captura de AFB1	47
3.12	Actividad lactato deshidrogenasa (LDH)	50

Abreviaciones:

PS: permeado de suero.

BAL: bacterias ácido-lácticas.

SLC: sobrenadante libre de células.

PSFG: permeado de suero fermentado con gránulos de kefir CIDCA AKK1.

%IG: porcentaje de inhibición de la germinación.

Fase Lag: fase de latencia (h).

K_D : velocidad o tasa de crecimiento (mm/h).

IIK_D : índice de inhibición de la velocidad de crecimiento (%).

LagT/LagC: relación entre la fase de latencia de un tratamiento en relación al control del ensayo.

$CIF_{\text{láctico}}$: concentración inhibitoria fraccional del ácido láctico.

$CIF_{\text{acético}}$: concentración inhibitoria fraccional del ácido acético.

$CIF_{\text{índice}}$: $CIF_{\text{láctico}} + CIF_{\text{acético}}$.

AFB₁: aflatoxina B₁.

ZEA: zearalenona.

MTT: sal de tetrazolio bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazolio

IP: yoduro de propidio.

LDH: lactato deshidrogenasa.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1 INTRODUCCION

Este trabajo se desarrolló dentro de la línea de hongos toxigénicos del grupo de Bacterias Ácido Lácticas de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Como objetivo central se buscó estudiar el efecto antifúngico del kefir sobre hongos cuya contaminación y/o toxinas son comunes en alimentos, tanto para humanos como animales; por lo cual se eligió *Fusarium graminearum*, *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* y la aflatoxina B₁. En primera instancia se estudió la actividad antifúngica de los microorganismos y de los sobrenadantes libres de células obtenidos de la fermentación de diferentes sustratos (leche y permeado de suero) con gránulos de kefir, y se comparó con la inhibición generada por ácidos orgánicos puros. Además de la inhibición fúngica, se buscó determinar si la presencia de dosis sub-letales podría ejercer un cambio en la producción de micotoxinas en los hongos tanto en medios de cultivo como alimento para aves. Dado que el objetivo de esta línea de investigación es aportar a la protección de los alimentos y los consumidores contra la contaminación fúngica, sean animales o humanos, también se estudió la capacidad protectora de los microorganismos del kefir sobre las líneas celulares Caco2-TC7 y HepG2, en presencia de aflatoxina B₁. Los estudios fueron realizados en tres instancias. Se hicieron experimentos en medios de cultivo para hongos donde se determinaron las concentraciones fungicidas mínimas, o el efecto producido sobre la germinación de conidios, la fase de latencia y la tasa de crecimiento. También se hicieron estudios de la capacidad protectora del kefir aplicado en alimento para aves contra la contaminación fúngica y en líneas celulares contra la presencia de aflatoxina B₁. Con base en estos objetivos, se desarrollará a continuación una introducción que abarca las generalidades de los hongos toxicogénicos, algunas técnicas de inhibición fúngica aplicadas comercialmente, la actividad antifúngica de los ácidos orgánicos, las BAL y el kefir, y por último, algunos aspectos sobre el permeado de suero, sustrato empleado ampliamente en esta investigación.

1.1 Hongos filamentosos y micotoxinas de los alimentos

Las micotoxinas son metabolitos fúngicos que representan la categoría mas importante de toxinas naturales en relación con la salud humana y el impacto económico que producen (Cole y Cox., 1981; Ciegler y col., 1981; IARC, 2002; Pit y Hocking, 2009). De acuerdo a su naturaleza bioquímica tienen efecto tóxico de tipo carcinogénico, teratogénico,

mutagénico, estrogénico, neurotóxico o inmunotóxico sobre la salud (McKean y col., 2006). En general las micotoxinas se producen a temperaturas óptimas entre 25 y 32°C, contenido de humedad en el grano superior al 12% pero inferior al 16% y a una humedad relativa de 85% (Williams y col., 2004; Strosnider y col., 2006).

Tanto en Argentina como a nivel mundial, *Fusarium graminearum* es el principal agente causal de la fusariosis de la espiga o *scab* que afecta principalmente al trigo (Goswami y Kistlerm 2004) y a la cebada, como también al sorgo y el mijo, entre otros, causando grandes pérdidas económicas debido a la reducción del rendimiento y calidad de los granos (Parry y col., 1995; Lidell, 2003; Pirgozilev y col., 2003). Esta especie produce además micotoxinas como zearalenona y tricotecenos como el deoxinivalenol (DON). DON es un inhibidor potente de la síntesis de proteínas y por lo tanto representa riesgos tanto para la salud humana como animal (Desjardins y col., 1993; Paulitz, 1999). Las toxinas de *Fusarium* se pueden producir en campo (Xu y Berrie, 2005) o durante el almacenamiento de los granos.

Otras de las micotoxinas, las aflatoxinas (AFs), representan un grupo de compuestos derivados de la difuranocumarina sintetizados durante el metabolismo secundario de hongos pertenecientes a diferentes especies de *Aspergillus* como son *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. ochraceus* y *A. australis*. La mayor proporción de aflatoxinas determinadas en alimentos alrededor del mundo provienen de *A. flavus* y *A. parasiticus* (IARC, 2002, 2006, 2012). Las principales AFs son AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂, siendo AFB₁ uno de los agentes genotóxicos y hepatocarcinogénicos mas potentes (Busby y Wogan, 1984; Sharma y Salunkhe, 1991; Miller y Trenholm, 1994; Wang y col., 1998). Las aflatoxinas están clasificadas en el grupo 1 de agentes carcinogénicos para humanos, los cuales se definen como aquellos capaces de aumentar la incidencia de neoplasmas malignos, reducir su latencia o aumentar su severidad o multiplicidad (IARC 2006, 2012).

La dieta cotidiana es la primera fuente no ocupacional de exposición humana a las aflatoxinas las cuales se encuentran en una gran variedad de productos agrícolas pero principalmente en maíz, maní, semillas de algodón y nueces (IARC, 2012). Además de los productos que se contaminan durante su cultivo, las aflatoxinas también están presentes en carne, huevos y leche de animales de granja alimentados con productos contaminados con aflatoxinas (Strosnider y col., 2006; Bennet y Klich, 2003; Fink-Gremmels, 1999). La exposición dietaria y la infección crónica con el virus de la hepatitis B (HBV) y C (HBC) son las causas principales de hepatocarcinoma (HCC) en las regiones de mayor riesgo, las

cuales incluyen el África sub-Sahariana, Asia oriental y partes de sur América, concentrándose el mayor riesgo en los países localizados entre los 40° Norte y 40° Sur del ecuador. Además, la incidencia de ambos factores es mayor en zonas rurales que urbanas (Williams y col., 2004; Wild y Hall, 2000; Oyagbemi y col. 2010; Kew, 2013; Qui y col., 2015). Aproximadamente el 80% de la totalidad de individuos expuestos a las aflatoxinas viven en estas regiones, y la mitad de estos son habitantes del África sub-Sahariana. Se estima que más del 25% de las cosechas mundiales están contaminadas con micotoxinas (Strosnider y col., 2006). La concentración máxima de aflatoxinas permitida en alimentos para humanos varía entre los países entre 4 y 30 ppb (Williams y col., 2004). La Comisión Europea ha establecido un límite de 5 mg/kg para aflatoxina B₁ y de 10 mg/kg para aflatoxinas totales (sumatoria de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂) para el maíz que va a ser clasificado o que va a sufrir otros tratamientos físicos antes de ser consumido por humanos o empleado como ingrediente en productos comestibles (EC, 2010).

De acuerdo a la forma de ingesta se presentan dos formas de intoxicación. La primera es la aguda que causa daño directo sobre el hígado con la consiguiente enfermedad y muerte y el segundo es la exposición crónica asociada al desarrollo de carcinoma hepatocelular (HCC) (Williams y col. 2004; Liu y col. 2010), la cual se asocia también a la hepatitis crónica (Qui y col., 2015).

Entre los factores ambientales más importantes que influyen sobre el crecimiento de los hongos y la producción de micotoxinas se encuentran la temperatura y la actividad acuosa. Los hongos toxicogénicos presentan diferentes requerimientos en lo que respecta a la temperatura óptima así como para valores de actividad acuosa que resultan limitantes para su desarrollo y para la biosíntesis de las toxinas. En muchos casos la producción de la toxina ocurre en un rango de actividad acuosa más alta que las requeridas para el crecimiento del hongo y en un rango de temperatura más estrecho (Magan y Lacey, 1984). Los límites para el crecimiento de *A. flavus* se han definido previamente. *A. flavus* es capaz de crecer entre 10-12 °C y 43-48 °C, con una temperatura óptima alrededor de 33 °C (Pitt y Hocking, 2009). La a_w mínima para su crecimiento es alrededor de 0,82 a 25 °C, 0,81 a 30 °C y 0,80 a 37 °C (Pitt y Miscamble, 1995). Su crecimiento puede tener lugar en el rango de pH de 2 a 11, entre 25 y 37 °C, con un crecimiento óptimo en un rango amplio de pH entre 3,4 y 10 (Wheeler y col., 1991), mientras que la producción óptima de aflatoxinas tiene lugar a una actividad acuosa de 0,99; es decir, a la a_w de los granos o nueces frescos (ICMSF, 1996; Gqaleni y col., 1997).

Los rangos de temperatura, pH descritas para el crecimiento de *A. parasiticus* son similares a las de *A. flavus*. El rango de temperatura de crecimiento para *A. parasiticus* se ha descrito con algunas variaciones entre diferentes autores. Esta en el rango de 12 a 42°C (ICMSF, 1996); 10 a 45°C (Santos, 1995), 6 a 45°C (Lacey, 1989) y la temperatura óptima está alrededor de 32°C (Santos, 1995; ICMSF, 1996) ó 35-37°C (Lacey, 1989). El rango de temperatura para la producción de micotoxinas va de 11 a 35°C (Santos, 1995) ó 12 a 40°C (ICMSF, 1996), según los autores citados, siendo la temperatura óptima de 22°C (Santos, 1995) ó 25°C (ICMSF, 1996). Este hongo crece en un rango de pH entre 2 y 8 (Soriano del Castillo, 2007) ó 2 y 11 (ICMSF, 1996), siendo el pH óptimo cercano a 5-6 (ICMSF, 1996; Soriano del Castillo, 2007). La a_w óptima para su crecimiento es de 0,99 (ICMSF, 1996; Soriano del Castillo, 2007) y la a_w óptima para la producción de aflatoxinas se ha descrito a 0,95 (ICMSF, 1996) y a 0,99 (Moss, 1991). Según Hill y col., 1985, las condiciones óptimas para la producción de aflatoxinas para *A. parasiticus* y *A. flavus* tienen lugar a 33°C de incubación con una a_w de 0,99, mientras que para el crecimiento son 35°C y una a_w de 0,95. En un estudio reciente se modeló el efecto de la temperatura (10–40 °C) y a_w (0,80–0,98), en dos medios de cultivo (Agar Czapek extracto de levadura y agar extracto de maíz) sobre la tasa de crecimiento y los límites de crecimiento de tres cepas de *A. flavus* aisladas de maíz en Argentina. El modelo definido permitió establecer las temperaturas de almacenamiento requeridas para un mes de almacenamiento de acuerdo a la a_w del maíz. Se requiere una temperatura inferior a los 15 °C y a los 27 °C para maíz húmedo (a_w 0,90) y maíz seco (a_w 0,80) respectivamente; mientras que no es necesario establecer un valor mínimo si la a_w es inferior a 0,77 (Astoreca y col., 2012)

Las aflatoxinas constituyen un peligro especial particularmente en los cereales que constituyen la base de la dieta en muchos países en vía de desarrollo y la ingesta de aflatoxinas en el rango de nanogramos a microgramos por día se da principalmente a través del consumo de cereales y semillas como el maíz y el maní (IARC, 1993, 2002). Otros alimentos con concentraciones elevadas de carbohidratos y ácidos grasos, tales como el coco y el maní, favorecen la producción de aflatoxinas (Soriano del Castillo, 2007), que ocurre poco después de la infección de los granos a temperatura ambiente. Se ha reportado una gran variación de la contaminación fúngica transmitida por insectos, entre los granos de una misma planta y entre las plantas de un mismo cultivo (Carrillo, 2003). Aún cuando la contaminación con AFB₁ es mayor en los países tropicales que en

las zonas templadas del planeta, dada la globalización del consumo de los alimentos, no existe alguna región del planeta libre de aflatoxinas (IARC, 2002).

1.2 Mecanismo de acción de las aflatoxinas

Antes de describir el mecanismo de acción de las aflatoxinas, es importante destacar que aún cuando los alimentos posean niveles de contaminación relativamente bajos, su ingesta puede causar daños profundos en la salud cuando se consumen en grandes cantidades o durante largos períodos de tiempo (Kew, 2013). La exposición a las aflatoxinas comienza en el útero como resultado de la transmisión de toxinas a través de la placenta (Wild y col., 1992), continúa en el período pos-natal con la alimentación materna (Wild y col., 1987), y a través de la vida con la exposición crónica a estas y al virus de la hepatitis (Oyagbemi y col., 2010; Leong y col., 2012; Qui y col., 2015). La susceptibilidad a las aflatoxinas es mayor en los niños teniendo lugar hasta 5 millones anuales de muertes infantiles (por debajo de la edad de 5 años) atribuibles a la exposición a aflatoxinas en países en vías de desarrollo (Wild y col., 1987; Williams y col., 2004). Además, cabe señalar que las aflatoxinas son hepatocarcinógenos potentes en primates no humanos, roedores, peces y aves (Wogan y col., 2012).

Dada la alta liposolubilidad de la aflatoxina B₁, cuando ingresa en la ingesta es absorbida en el tracto gastrointestinal y es transportada por los glóbulos rojos y las proteínas plasmáticas hasta el hígado, mayoritariamente por vía portal (Figura 1.1)

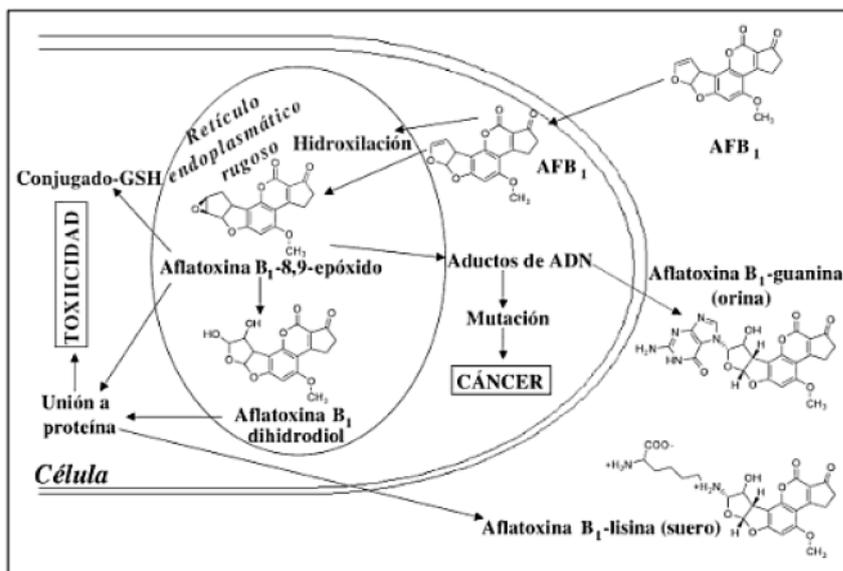


Figura 1.1 Mecanismo de acción de las aflatoxinas (Soriano de Castillo, 2007)

La toxicidad y carcinogenicidad de AFB₁ se atribuye a que una vez absorbida se concentra en el hígado donde es metabolizada por las enzimas microsomales de la familia del citocromo p450 (CYP) mediante mecanismos de hidroxilación, hidratación, dimetilación y epoxidación del anillo furano terminal dando lugar a la formación de dos intermediarios; uno altamente reactivo, exo-exopóxido-AFB₁ (capaz de unirse a las proteínas, a los ácidos ribonucleico y desoxirribonucleico y reaccionar con el gen supresor de tumores p53 y otro menos reactivo endo-epóxido-AFB₁ (AFBO). La mutación del gen supresor de tumores p53 (codón 249^{ser}-exon 7) contribuye significativamente a la replicación del ADN mutado y en consecuencia al desarrollo tumoral. El gen x del HBV (HBx) es el marco de lectura abierta mas común integrado en el genoma hospedero en el carcinoma hepatocelular y además, el HBx integrado muta con frecuencia en dicho carcinoma. Las proteínas mutantes provenientes de HBx conservan su habilidad de unirse a p53 por lo cual el daño se acentúa al atenuarse la reparación del ADN y la apoptosis mediada por p53 (Oyagbemi y col., 2010). CYP3A4, 3A5, 3A7 y 1A2 son las enzimas envueltas en el metabolismo de las aflatoxinas. Esta conversión enzimática tiene lugar por la función oxidasa microsomal (FOM) que esta presente principalmente en el hígado pero probablemente también en pulmones, riñones y otros tejidos. Se ha identificado polimorfismo de la región promotora de CYP3A5 lo cual se ha asociado a la variación en la concentración de biomarcadores, sugiriendo que la variación individual podría influenciar la sensibilidad a la aflatoxina. De otro lado, dado que la aflatoxina puede cruzar la placenta, se ha considerado el papel que cumple en la activación de AFBO por parte de CYP3A7, una CYP predominante en el hígado del feto humano (Degen y col., 1978; Bressac y col., 1991; Hendrickse, 1991; Hsu y col., 1991; Massey y col., 1995; Wang y Groopman, 1999; Moss, 2002; Wild y Turner, 2002; Kensler y col., 2003; Sudakin, 2003; Kamdem y col., 2006).

Se ha demostrado que en pollos, los microsomas poseen actividad enzimática de CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6 y CYP3A4 y que la actividad enzimática de CYP1A1 y CYP2A6 se relaciona con la bioactivación de AFB₁ en AFBO (Díaz y col., 2010).

El epóxido-AFB₁ es un producto inestable que forma ligandos o aductos con el ADN, lo cual puede generar mutaciones. La formación de aductos tiene lugar mediante la unión covalente con el nitrógeno N7 de los residuos de guanina del ADN para formar el compuesto promutagénico predominante aducto 8,9 dihidro-8-(N7 guanil)-9-hidroxi-AFB₁ (AFB₁-N7-Gua) (Montesano, 1997; Wild y Turner, 2002). AFB₁-N7-Gua se puede transformar en dos compuestos secundarios; un sitio apurínico y un aducto AFB₁-formamidopirimidina (AFB₁-FABY). La incorporación de AFB₁-FABY en la doble

cadena de ADN es mutagénica (Brown y col., 1999) y estas mutaciones son altamente reactivas con el ADN causando cambios que en el tiempo constituyen riesgo de transformaciones malignas (IARC, 2002; Mc Glynn y col., 2003; Kew, 2013). Mas precisamente, el aducto AFB₁-FABY causa mutaciones por transversión de guanina (G) a timina (T) con una frecuencia seis veces superior al aducto AFB₁-N7-Gua (Hussain y col., 2007). Después de la formación del epóxido pueden formarse dihidrodioles, los cuales se unen a proteínas celulares induciendo daño celular y eventualmente la muerte celular. Éstos también pueden formar aductos con residuos de lisina de la albúmina y otras proteínas celulares (Steyn y Stander, 1999).

El hígado es el órgano más afectado por los efectos tóxicos de la aflatoxina siendo los resultantes una serie de daños al metabolismo de proteínas, carbohidratos y lípidos así como la necrosis de los hepatocitos y de otras células activas metabólicamente (Degen y col., 1978; Eaton y Groopman, 1994; Wild y Turner, 2002; Kandem y col., 2006). La aflatoxina actúa sobre diversas estructuras de los hepatocitos. En el núcleo inhibe la enzima ARN-polimerasa ADN dependiente, inhibiendo así la síntesis proteica. En el retículo endoplasmático causa desgranulación y ruptura de los polisomas, inhibiendo muchas funciones metabólicas tales como la síntesis de proteínas y la inducción de enzimas; además interfiere directamente en la coagulación sanguínea (Degen y col., 1978). Las aflatoxinas actúan sobre algunas enzimas de la cadena transportadora de electrones inhibiendo la incorporación de oxígeno por los tejidos y disminuyendo la producción de ATP (Ellis y col., 1991).

Un paso de detoxificación importante es la biotransformación del epóxido-AFB₁ en un metabolito menos tóxico, mediante la reacción con glutatión en un mecanismo mediado por la glutatión-S-transferasa (Ross y col., 1992). Este metabolito es excretado en la orina como ácido mercaptúrico (Montesano, 1997). Otra forma de detoxificación es la unión del epóxido-AFB₁ de forma covalente con los residuos de guanina del ADN, que se excretan por vía urinaria (Urrego y Díaz, 2006).

Es importante resaltar que desde en la naturaleza tiene lugar la co-contaminación de alimentos con diferentes hongos y en consecuencia con sus micotoxinas, tales como aflatoxina B₁ y fumonisina B₁. Estudios realizados desde la década de los años 90 en muestras de alimentos obtenidas de áreas endémicas de cáncer primario de hígado han permitido determinar que la co-exposición es otro factor de riesgo para el desarrollo de cáncer primario de hígado (Wang y col., 1995; Ueno y col., 1997). A estos factores de riesgo se suma la infección crónica con el virus de la hepatitis (HBV y HCV) (IARC,

1994). En estudios recientemente publicados se determinaron, en pacientes chinos, los codones y exones donde se concentran las mutaciones causadas por estos factores (Qui y col., 2015).

Se han estudiado los efectos de las micotoxinas tanto individualmente como su efecto combinado sobre algunos modelos de líneas celulares y animales de laboratorio. Se investigó el efecto de las mezclas de aflatoxina B₁ y fumonisina B₁ sobre cultivos celulares de células HepG2, provenientes de hepatocarcinoma humano. La mezcla de micotoxinas incrementó los efectos tóxicos en comparación a cuando fueron suministradas individualmente. Los autores encontraron que en presencia de dosis bajas de micotoxinas, la viabilidad celular aumentaba levemente, pero que esta era visiblemente afectada a medida que las concentraciones aumentaban (Mc Kean y col., 2006). Se encontró que la co-contaminación con aflatoxina B₁ y fumonisina B₁ en la misma muestra de alimento suministrado a lechones de cerdo y pavos genera efectos negativos en la salud y crecimiento, entre aditivos y sinérgicos en los cerdos y aditivos en los pavos (Harvey y col., 1995; Kubena y col., 1995). Otros estudios realizados con ratas Wistar determinaron el efecto sinérgico sobre la reducción de ganancia de peso corporal causado por la administración oral de aflatoxina B₁ y fumonisina B₁ (Pozzi y col., 2001) mientras que el tratamiento secuencial de ratas con AFB₁ y FB₁, potenció la iniciación de cáncer en hepatocitos. Al parecer, el pre-tratamiento con AFB₁ aumentó el potencial iniciador de FB₁ al hacer el hígado más susceptible a los efectos tóxicos de esta toxina (Gelderblom y col., 2002). Dado la presencia combinada de las micotoxinas y el efecto sinérgico en el daño sobre la salud y crecimiento, las investigaciones buscan determinar se estudia no solo el efecto tóxico de la combinación de micotoxinas sino la capacidad de secuestro de éstas por microorganismos probióticos y otros agentes, para la reducción del daño.

1.3 Contaminación por hongos y micotoxinas en alimentos para crianza de aves

Es importante señalar que en la Unión Europea, las concentraciones máximas de aflatoxina B₁ en alimento para aves se han establecido entre 20 y 50 µg/kg. Aun más, con base en los estudios sobre la variación en la contaminación fúngica de los alimentos para animales, se han recomendado los límites para otras micotoxinas como ocratoxina A, deoxinivalenol, zearalenona y fumonisinas B₁ y B₂ (OJEC, 2002; OJEU, 2006; Commission Regulation (EU), 2011).

En Argentina se ha estudiado desde hace algunas décadas atrás la presencia de hongos filamentosos y micotoxinas en maíz y en alimento para aves (Dalcero y col., 1997, 1998; Magnoli y col., 1998, 1999, 2002; Monge y col., 2012, 2013). En la provincia de Córdoba se encontraban entre los hongos con mayor prevalencia los pertenecientes a *Aspergillus* spp (85%) y a *Fusarium* spp (70%). Del género *Aspergillus* las especies identificadas con mayor frecuencia fueron *A. flavus* y la micotoxina más significativa fue AFB₁ presente en un 48% de las muestras estudiadas, con concentraciones entre 10 y 123 ng/g. Le siguió la zearalenona (ZEA) con niveles mayores a 327 ng/g mientras que DON no se detectó (Magnoli y col., 1998), a diferencia de lo que se hallaría en estudios posteriores. El maíz es una materia prima fundamental en la alimentación aviar; en Argentina se producen entre 13 y 22 millones de toneladas anuales de maíz (SAGPyA, 2005; Maizar, 2006; INDEC, 2009; USDA 2010) de las cuales, 2,8 millones se emplean en la producción de aves (SAGPyA, 2005; ILSI, 2006). En un estudio desarrollado durante la década que comprende 1999 a 2010 se determinó la presencia y concentración de diferentes micotoxinas en muestras de maíz recién cosechadas y almacenadas. El nivel de aflatoxinas fue bajo excepto para los granos en cosecha de 2003 y en almacenamiento de 2007, siendo los valores medios de aflatoxina B₁ entre 0,38 y 2,54 mg/kg para muestras recién cosechadas y entre 0,22 y 4,5 mg/kg para las muestras en almacenamiento. Los valores medios y la frecuencia de contaminación con zearalenona (ZEA) y deoxinivalenol (DON), permanecieron bajos para todos los años. ZEA tuvo valores medios entre no detectable y 83 mg/kg en maíz recién cosechado; y entre no detectable y 17 mg/kg en muestras almacenadas. En cuanto a DON, los valores fluctuaron entre no detectable y 140 mg/kg en muestras recién cosechadas y entre no detectable y 14 mg/kg en muestras almacenadas. En un 90 al 100% de todas las muestras se detectó presencia de fumonisinas cuyos niveles de concentración fueron de 1.773 a 9.093 mg/Kg en maíz recién cosechado y de 2.525 a 11.528 mg/kg en maíz almacenado. También se determinó la co-ocurrencia de micotoxinas en los siguientes porcentajes. La co-ocurrencia de mayor frecuencia fue de aflatoxinas y fumonisinas en un 8,4%, seguida de ZEA y fumonisinas en un 2% (Garrido y col., 2012). Estudios recientes sobre la contaminación del alimento para pollos en la provincia de Entre Ríos, muestran un panorama más amplio de las micotoxinas presentes en los alimentos. Se determinó que los recuentos fúngicos totales estaban por debajo del máximo establecido (1×10^4 UFC/g) y que las únicas especies aflatoxigénicas aisladas pertenecían a *A. flavus* y *A. parasiticus*. En cuanto a las micotoxinas, se determinó la co-ocurrencia de fumonisina B₁ con toxina HT-2 y T-2 en el 100% de los alimentos, con

niveles medios entre 4.502 y 5.813; 6,7 a 21,6 y 19,6 a 30,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente. Un gran número de las muestras de alimento iniciador estaba co-contaminado con aflatoxina B₁, fumonisina B₁ y toxinas HT-2 y T-2 (Monge y col., 2013). Mas recientemente se ha estudiado la microbiota y la presencia de micotoxinas en alimento para aves en la región central (Provincia de Buenos Aires y La Pampa) y sur (Río Negro), determinando la presencia de fumonisinas (media 1.750 ppb), el 90% de las muestras contenían DON (media de 222 ppb) y OTA (media de 5 ppb). El 90% tenían aflatoxinas (media de 2.685 ppb), 86% ZEA (media de 50 ppb) y 78% presentaban toxina T2 (media 50 ppb). Las concentraciones más altas determinadas correspondieron a 6000 ppb de fumonisinas y 318 ppb de DON (Greco y col., 2014).

Se ha calculado que la tasa de crecimiento en la producción de carne de pollo se triplicó durante las cinco décadas pasadas (FAO, 2013), lo cual implica tener en cuenta el control de la contaminación microbiológica de los alimentos que se les suministran, dado que la presencia de hongos filamentosos afecta sus propiedades sensoriales y su calidad nutricional (Cegielska-Radziejewska y col., 2013).

Los hongos -y otros microorganismos- utilizan y asimilan los nutrientes disponibles en los sustratos donde crecen y esto lleva a una pérdida entre el 5 y el 100% de los nutrientes presentes (Okoli y col., 2006). Se ha encontrado que los valores de energía, proteína cruda y grasa cruda en maíz mohoso disminuyen en un 5, 7 y 63%, respectivamente (Di Constanzo y Murphy, 2012). Para obtener aves saludables se requiere suficiente cantidad de carbohidratos, lípidos y proteínas, junto a las vitaminas y minerales necesarios en la dieta (Gillespie y Flanders, 2009; Damerow, 2012). Recientemente se realizó una investigación sobre la contaminación fúngica y el efecto sobre la calidad nutricional de alimentos para aves de varias regiones de Argentina (Región central -provincias de Buenos Aires y La Pampa- y provincia de Río Negro), determinando que el 90% de las muestras analizadas presentó algún tipo de deficiencia nutricional. Aunque el 97% de las muestras tuvieron la humedad adecuada, el 50% y el 77,5% no alcanzaron el contenido mínimo requerido de proteína y lípidos respectivamente, mientras que el 23,7% excedió el contenido de cenizas. Dado que la calidad nutricional que aporta la carne de pollo se basa en su contenido de proteína, hierro, zinc, fósforo, niacina, ácido fólico y vitaminas A, B6 y B12, la obtención de ésta depende de las condiciones de su alimentación (Greco y col., 2014).

Además de la alteración sensorial y nutricional de los alimentos, los hongos pueden sintetizar micotoxinas (Shareef, 2010), que como ya se discutió, son metabolitos fúngicos

que causan enfermedades y mortalidad en los animales al ser ingeridas a través del alimento, además de generar un gran impacto económico (Cole y Cox, 1981; Ciegler y col., 1981. Al igual que en los humanos, en los animales pueden causar daños de tipo carcinogénico, mutagénico, teratogénico, neurotóxico, inmunotóxico y estrogénico (McKean y col., 2006; Cegielska-Radziejewska y col., 2013) y producen contaminación secundaria en humanos al consumir huevos, carne o leche provenientes de los animales alimentados con pienso contaminado (Nyamongo y Okioma, 2005).

La mayor parte de las micotoxicosis de aves son causadas por una ingesta crónica de micotoxinas en baja concentración, observándose los síntomas crónicos típicos como crecimiento lento, baja eficiencia en la transformación de alimento y producción por debajo del rango óptimo. En caso de ocurrir ingestión de micotoxinas en altas concentraciones, se presentan síntomas clínicos asociados con órganos vitales específicos, el sistema inmune y otros aspectos de la fisiología aviar así como la muerte de los individuos (Cegielska-Radziejewska y col., 2013).

El consumo de una dieta contaminada con micotoxinas puede inducir efectos agudos y tóxicos a largo plazo (Binder y col., 2007; Venancio y Paterson, 2007) y se ha asociado a menor tasa de crecimiento y aumento de la mortalidad de las aves (Oguz y Kutoglu, 2000). La adición al alimento para pollos de aflatoxina B₁ y ocratoxina A en concentraciones de 200 y 10 ppb respectivamente causa un aumento en la morbimortalidad, descenso en la ganancia de peso y mayor sensibilidad a la enfermedad de Gumboro. Lo último se determinó al observar que los títulos de anticuerpos frente a la enfermedad bursal infecciosa descendieron en relación a los controles, indicando un efecto deletéreo sobre la respuesta inmune corporal debido a la ingesta de micotoxinas (Okiki y col., 2010)

1.4 Técnicas de control fúngico en alimentos

Antes de describir las técnicas que se emplean en el control de hongos en alimentos, es importante resaltar las recomendaciones que se hacen actualmente sobre la importancia del estudio de la microbiota contaminante de los productos dado que esto permite conocer las micotoxinas que pueden ser producidas y son un indicador de la calidad higiénica del alimento para las aves (Khosravi y col., 2008; Greco y col., 2014).

Existen muchas estrategias que se aplican desde el campo hasta el almacenamiento para reducir la presencia de micotoxinas en los alimentos para humanos y animales. Entre estas se cuentan la rotación de cultivos, el desarrollo de cultivares de mayor resistencia a

insectos y hongos, la aplicación de fungicidas y mejoramiento de las prácticas de cultivo en campo entre otras. No obstante, ya desde el cultivo ha surgido la demanda por la aplicación de métodos alternativos a los fungicidas que sean amigables al medio ambiente, tales como el control biológico, o que en primera instancia sean un complemento al control químico de hongos fitopatógenos y toxigénicos. Entre los controles biológicos que se usan en Argentina se han incluido bacterias nativas, levaduras y hongos filamentosos (Chulze y col., 2014). En el caso del trigo, la aplicación de aislados de *Clonostachys rosea* redujo la colonización de la espiga por *Fusarium* (Palazzini y col., 2013). En el maíz, la aplicación de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Microbacterium oleovorans* logró el control del crecimiento y la acumulación de fumonisinas por *F. verticillioides* en la etapa de pre cosecha (Pereira y col. 2007, 2009). En maní se ha logrado el control *A. flavus* toxigénico y la acumulación de aflatoxinas al generar la exclusión por competencia usando cepas nativas no toxigénicas de *A. flavus* (Alaniz y col., 2013). En lo referente a la producción de uvas, las cepas de *Kluyveromyces thermotolerans* han reducido el impacto de *Aspergillus* section *Nigri* y la acumulación de ocratoxina A (Ponzzone y col., 2011).

En el almacenamiento de los granos se aplican diversas estrategias para reducir la contaminación fúngica. La humedad relativa se mantiene por debajo del 70% y la humedad de los granos y semillas por debajo del 15% (Christensen y Meronuck, 1987). La temperatura del silo se establece en 14 °C y además se deben airear los granos almacenados (Bogliachini, 2006) y aplicar fungicidas (Milus y Parson, 1994).

Tal como se expuso previamente, la aplicación de fungicidas es controvertida, pues se ha encontrado que la aplicación de dosis subletales de algunos fungicidas puede causar incremento en la producción de micotoxinas por algunas especies de *Fusarium* y *Aspergillus* (Milus y Parson, 1994; D’Mello y col., 1998). Estos efectos se han observado en diferentes estudios *in vitro* empleando compuestos que inhiben el crecimiento de diversas especies de *Fusarium* pero que en aquellos capaces de superar la acción inhibitoria, causaron incremento en la producción de fumonisinas, tricotecenos, DON y Nivalenol (Moss y Frank, 1985; Magan y col., 2002; Ramirez y col., 2004; Kokkonen y col., 2014)

Desde la década de 1990 también se han realizado estudios con adsorbentes para eliminar las micotoxinas de piensos contaminados y reducir al mínimo sus efectos contra la salud de aves de corral (Ibrahim y col., 2000). Varios métodos han sido investigados para evitar o reducir la toxicidad de AFB₁ en pollos de engorde, utilizando adsorbentes comerciales (Denli y col., 2009; Kaoud, 2014), los cuales han sido efectivos en ensayos *in vitro*

(Phillips y col., 1988; Huff y col., 1992; Díaz y col., 2002). Sin embargo estos resultados a menudo no se correlacionan bien con su potencial *in vivo* (Watts y col., 2003; Miazzo y col., 2005).

Otro método para eliminar o evitar la presencia de aflatoxinas es la irradiación con rayos gama la cual ha demostrado capacidad de inhibir o retrasar el desarrollo de hongos toxigénicos y en consecuencia la producción de micotoxinas. Bajo ciertas condiciones, la irradiación con rayos gama puede destruir también directamente las micotoxinas. Se ha demostrado que la carga fúngica puede ser reducida sustancialmente con niveles mínimos de 5 kGy pero se puede reducir si los productos se tratan previamente en agua caliente. El proceso radiolítico depende de factores tales como las dosis absorbidas, la concentración inicial fúngica o de micotoxinas, la posición del sistema irradiado, la cantidad de humedad y la presencia de otros compuestos en la matriz. La radiosensibilidad de los hongos depende también de las características de las cepas, si predomina el micelio vegetativo o esporas y el contenido de humedad de las esporas o los alimentos. El efecto del tratamiento mejora cuando se combina con otros preservantes tales como peróxido de hidrógeno o bicarbonato de amonio. Algunos aspectos limitantes consisten en que la inactivación no se dé completamente y el alimento tenga alta humedad, lo cual puede conducir a una alta recuperación fúngica y tal como se describió para otros tratamientos, se puede aumentar la capacidad toxicogénica del hongo. De otro lado, las micotoxinas secas son extremadamente radioresistentes mientras que son sensibles cuando están en solución, ya que son degradadas por los radicales originados en la radiolisis del agua. Finalmente, la pérdida de toxicidad después de la irradiación solo ha sido demostrada con AFB₁ (Calado y col., 2014).

Otras técnicas preservantes son las atmósferas modificadas o adición de conservantes como el ácido propiónico y sus sales. Sin embargo, la creciente demanda de los consumidores impulsa la búsqueda de métodos de bioconservación (Gerez y col., 2009).

1.4.1 Aplicación de ácidos orgánicos puros en el control del desarrollo fúngico

En la inhibición fúngica también se han empleado ácidos orgánicos. La actividad antifúngica óptima tiene lugar a bajo pH y cerca al pKa del ácido ya que se favorece la forma no disociada del ácido a la cual es permeable la membrana celular de los microorganismos (Bogaert y Naidu, 2000). La forma neutral se difunde a través de la membrana citoplásmica del hongo (Cramer y Prestegard, 1977) y disocia dentro de la

célula debido al pH interno superior al exterior. Allí tiene lugar la acción preservante debido a la acumulación de aniones y protones dentro de la célula (Brul y Coote, 1999; Jay, 2000). Los protones liberados desestabilizan el pH neutro intracelular y rompen el gradiente de membrana celular (Salmond y col., 1984). Debido al gasto de energía durante el bombeo de protones hacia el exterior de la membrana, ocurre un gasto del ATP necesario para el crecimiento celular y así se detiene el crecimiento del micelio (Hunter y Segel, 1973). Si un par de compuestos antimicrobianos con diferentes mecanismos de inactivación se aplican juntos, es posible alcanzar un efecto sinérgico con un consecuente mayor control microbiano. Sin embargo, si ocurre un efecto antagónico, la efectividad de los antimicrobianos se reduce significativamente (Davidson y Parish, 1989; López-Malo y col., 2005). Los ácidos láctico y acético han sido empleados como inhibidores fúngicos, ambos poseen categoría GRAS (reconocidos generalmente como seguros), su concentración máxima en los alimentos está definida por los parámetros sensoriales, están presentes en los alimentos fermentados naturalmente, son de fácil adquisición en el mercado y su efecto inhibitorio se basa en la “teoría de los ácidos débiles” descrita atrás (Freese y col., 1973; Salmond y col., 1984; Stratford y col., 2009). Además, ya los estudios realizados desde décadas atrás han demostrado efectos sinérgicos entre ambos ácidos láctico y acético (Rubin, 1978; Dickson y Maynard, 1992; Adams y Hall, 1988). En nuestro grupo, con el fin de realizar un acercamiento al efecto de la actividad antifúngica de los principales ácidos orgánicos determinados hasta ahora en kefir (láctico y acético) se realizó un estudio previo en el cual se demostró que dichos ácidos puros inhiben el crecimiento de *A. flavus* en concentraciones de 0,24% y 2,5% v/v en medio sólido y que la mezcla de ambos ácidos posee un efecto sinérgico, posibilitando la reducción de ambas concentraciones para inhibir el crecimiento del hongo (León y col., 2012).

En las últimas décadas del siglo XX se generalizó el estudio de productos de origen natural, y microorganismos aislados de fermentaciones naturales a fin de evaluar su actividad antimicrobiana. Lo anterior ha impulsado la investigación sobre la actividad antimicrobiana y antifúngica de microorganismos como bacterias lácticas y levaduras tales como las presentes en el kefir.

1.4.2 Actividad Antifúngica de las Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

La actividad antifúngica de las bacterias ácido-lácticas (BAL) incluye la producción de compuestos inhibidores como productos de la fermentación así como su capacidad de secuestrar las micotoxinas presentes en el alimento.

Desde la década de los años 90 se multiplicaron los estudios demostrando la capacidad antibacteriana, antifúngica y de secuestrar micotoxinas por parte de estos microorganismos y de sus metabolitos (Corsetti y col., 1998; Haskard y col., 2001; Peltonen y col., 2001; Lavermicococca y col., 2000, 2003; Magnusson y Schnürer, 2001; Magnusson y col., 2003; Sjögren y col., 2003; Schnurer y Magnusson, 2005; Onilude y col., 2005; Hernández – Mendoza y col., 2009; Gerez y col. 2009, 2013). Los metabolitos producto de la fermentación incluyen ácidos que reducen el pH (ácidos fórmico, láctico, acético, propionico y fenil láctico entre otros), peróxido de hidrógeno y diacetilo (Lavermicococca y col., 2000, 2003; Gerez y col., 2009; 2013; Cortez-Zavaleta y col., 2014). Se ha estudiado también la capacidad antifúngica de bacterias ácido lácticas y propiónicas obteniendo que los principales metabolitos que inhiben *A. fumigatus* y *A. nidulans* incluyen los ácidos acético y propiónico, mientras que el ácido láctico presenta un efecto inferior; mas aún, la concentración necesaria para la inhibición fue mayor con el incremento del pH (Lind y col., 2005). Cuando se evaluó la actividad antifúngica de 91 aislados de BAL, los compuestos responsables del efecto antifúngico fueron los ácidos ya descritos láctico, acético y feniláctico junto con un péptido producido por *L. fermentum* (Gerez y col., 2013). Otros autores afirman que la actividad antifúngica no se debe sólo a un tipo de ácido sino que depende de la acción sinérgica entre los ácidos presentes dentro de los productos de la fermentación (Cortés-Zavaleta y col., 2014).

También se han aislado péptidos pequeños y bacteriocinas (Anastasiadou y col., 2008; Gerez y col. 2013; Kruger y col., 2013). La primera bacteriocina reportada fue la Nisina en 1928, (Rogers, 1928), la cual es permitida en más de 40 países y se ha empleado como preservante durante más de 50 años. Dado que las BAL son consideradas GRAS, muchas bacteriocinas tienen una aplicación potencial en la industria de alimentos para inhibir el crecimiento de patógenos (Miao y col., 2014). Entre las bacteriocinas mas recientes, se ha reportado que *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 aislado de gránulos de kefir en China, produce la bacteriocina F1, la cual inhibe el crecimiento de *A. flavus*, *A. niger* y *P. glaucum* en una concentración de 250 µg/ml y *Rh. nigricans* en concentración de 125 µg/ml (Miao y col., 2014). Más recientemente se han incorporado cultivos de BAL con

actividad bioprotectora a los productos (como alternativa a los aditivos químicos en alimentos) fermentados como el yogurt, los cuales deben presentar características como ser activos en la menor concentración posible (Suomalainen y Mäyrä-Makinen, 1999; Schwenninger y Meile, 2004; Delavenne y col., 2013, 2015), resistir las condiciones de fermentación (concentración de sustrato, tiempo y temperatura de fermentación, etc.), no competir con el inóculo, no alterar las propiedades sensoriales del producto (Holzapfel y col., 1995) y mantener su actividad antifúngica durante el procesamiento y almacenamiento (Rouse y col., 2008; Zhang y col., 2010). Tal es el caso de *L. rhamnosus* K.C8.3.1I y *L. harbinensis* K.V9.3.1Np que inhiben hongos alteradores del yogurt tales como *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica*, *Penicillium brevicompactum*, *Kluyveromyces lactis* y *K. marxianus*. Se logró determinar una concentración mínima de inóculo de estas BAL de 5×10^6 UFC/ml en leche para inhibir el crecimiento de *Yarrowia lipolytica* durante un período de almacenamiento de 6 semanas a 10 °C. (Delavenne y col., 2013; 2015).

En los estudios sobre aflatoxinas, la investigación se ha enfocado intensamente en la captura de estas bajo diferentes condiciones *in vitro* e *in vivo* y disminuir la absorción intestinal a nivel del tracto gastrointestinal de animales y humanos (Phillips, 1999; El-Nezami y col., 2000; Gratz y col., 2004). Para ello se ha buscado la utilización de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) que tengan capacidad de disminuir la adherencia de patógenos y toxinas bacterianas a líneas celulares (Schnurer y Magnuson, 2005; Londero y col., 2015). Se ha demostrado que diferentes bacterias probióticas, en especial lactobacilos (El-Nezami y col., 1998^a; Haskard y col., 2001; Peltonen y col., 2001; Lee y col., 2003; Abbés y col., 2015) y diferentes levaduras tienen la capacidad de unirse eficientemente a AFB₁ *in vitro* (Armando y col., 2011; Pizzolito y col., 2012) y además disminuyen el estrés oxidativo causado por la ingesta de AFB₁ y fumonisina B₁ en ratones Balb/c (Abbés y col., 2015). Se ha estudiado la capacidad de captura de lactobacilos como *Lactobacillus rhamnosus* GG (El-Nezami y col., 1998^b; Haskard y col., 2000), la capacidad de captura e inhibición de producción de aflatoxinas por *L. casei* (Chang y Kim, 2007; Hernández-Mendoza y col., 2009; Abbés y col., 2015) y la capacidad de captura también de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Bueno y col., 2007; Pizzolito y col., 2011). Las toxinas pueden ser secuestradas mediante una unión fuerte de éstas con microorganismos, evitándose la absorción a nivel del tracto gastrointestinal. El secuestro depende de las propiedades superficiales de las bacterias involucradas las cuales a su vez están determinadas por las características fisicoquímicas y la naturaleza química de las

moléculas de la superficie bacteriana así como los factores presentes en el medio tales como el mucus intestinal, que reduce la capacidad de captura (Peltonen y col., 2000; Haskard y col., 2000; Gratz y col., 2004).

1.5 El Kefir

El kefir es un producto lácteo (o producido a partir de otros sustratos como soluciones azucaradas o derivados de la industria láctea) fermentado originado hace miles de años en las montañas caucásicas y Asia y su consumo es popular en países del este de Europa como Rusia, Polonia, República Checa, Alemania, Rumania y Eslovaquia, entre otros. Su consumo también data de la antigüedad en Asia donde se ha podido determinar que en la provincia de Xinjiang, China se consumía desde la edad de bronce (1800 a 1450 AC) y se incluían collares de gránulos en el ajuar de los muertos (Yang y col., 2014). En Europa del este la producción de kefir es industrial mientras que en Argentina es artesanal.

Los gránulos de kefir son masas gelatinosas, irregulares de color blanco o ligeramente amarillento, de consistencia elástica e insolubles en agua (Marshall, 1993; Abraham y De Antoni, 1999). En los gránulos de kefir se encuentra una asociación simbiótica de bacterias ácido lácticas homo y heterofermentativas, levaduras fermentadoras y no fermentadoras de la lactosa, bacterias ácido acéticas y *Geotrichum candidum*. Algunos de los microorganismos presentes en los gránulos de kefir y que se transfieren a la leche son: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Acetobacter*, *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* entre otros (Garrote, 1999) los cuales son responsables de la doble fermentación, ácido láctico y alcohólico, a consecuencia de la cual se obtiene una bebida con características organolépticas definidas (Zourari y Anifantakis, 1988; Kosikowski, 1982; Garrote 1999; Caro y León, 2014). Cuando se inocula el gránulo en leche (o en otro sustrato como solución azucarada o suero o permeado de suero), se inicia la fermentación, mediante los microorganismos contenidos en él, que crecen y se multiplican, pasando al sustrato. La leche fermentada contiene ácido láctico, ácido acético, etanol, dióxido de carbono, vitaminas del complejo B y compuestos aromáticos como diacetilo y acetaldehído. También está presente el kefiran, un polisacárido bacteriano constituido por D-glucosa y D-galactosa en proporción 1:1, soluble en agua que constituye un 25% del peso seco de los gránulos (Piermaría y col., 2008; Abraham y De Antoni 1999).

Es relevante aclarar que desde el punto de vista de la legislación, el kefir está reglamentado en el Código Alimentario Argentino como “El producto cuya fermentación

se realiza con cultivos ácido lácticos elaborados con granos de kefir, *Lactobacillus kefir*, especies de los géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Acetobacter*, con producción de ácido láctico, etanol y dióxido de carbono. Los granos de kefir están constituidos por levaduras fermentadoras de la lactosa (*Kluyveromyces marxianus*) y levaduras no fermentadoras de la lactosa (*Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* spp y *Streptococcus salivarius* subsp.termophilus) (CAA, 2006).

El kefir puede ser considerado una fuente de probióticos ya que presenta efecto antibacteriano, antimicótico, antineoplásico e inmunomodulador (Brialy y col., 1995; Zacconi y col., 1995; Garrote y col., 2000). Las propiedades antimicrobianas de las leches fermentadas han sido asociadas, principalmente, a la presencia del ácido láctico y acético. Garrote y col. (2000) evaluaron la presencia de ácidos orgánicos en fermentos obtenidos con gránulos de kefir CIDCA AGK1 en leche descremada estéril y caldo de cultivo MRS, detectando concentraciones de 2,21% v/v y 2,14% v/v de ácido láctico y 0,1% v/v y 0,62% v/v de ácido acético, respectivamente. Esta alta concentración de ácido acético en el caldo MRS se atribuyó al contenido de acetato de sodio como constituyente del medio de cultivo (5 g/l) (Garrote, 2000).

Se han estudiado las capacidades antimicrobianas del kefir en diferentes condiciones. han demostrado el poder inhibitorio de los gránulos de kefir liofilizados con glicerol y reconstituidos, sobre *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoneae* y *Escherichia coli*, pero no sobre *S. cerevisiae* ni *Candida albicans* (Brialy y col., 1995), mientras que en nuestro grupo se ha podido establecer mas recientemente, que los gránulos de la colección CIDCA AGK1 liofilizados en leche y almacenados durante 6 meses a 4°C, conservan no solo su capacidad fermentativa y recuento microbiológico sino también su capacidad inhibitoria contra *Salmonella* sp. y *E. coli* (Moretti, 2013). Se han estudiado los efectos protectores en animales y se ha reportado que la administración de kefir previene la colonización con *Salmonella kedougou* en pollos, adjudicando este efecto no solo a la complejidad de la microbiota del kefir, sino también a su integridad (Zacconi y col., 1995). En los últimos años nuestro grupo ha investigado el efecto causado por la administración de una cepa de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 a pollos en el agua de bebida. Se ha determinado que el microorganismo no sufre traslocación y es inocuo para el animal (Correa y col., 2014). En investigaciones donde se fermentó leche o suero de quesería con

gránulo entero de kefir, se estableció que el producto fermentado tenía actividad antimicrobiana frente a diversas bacterias patógenas como *E. coli*, *Salmonella* spp., *Salmonella entérica* serovar Enteritidis; *Shigella flexneri*, *S. sonnei*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella* y contra parásitos como *Giardia intestinalis* (Garrote, 2000; Kakisu y col., 2007; Londero y col., 2011, 2012, 2015; Correa y col., 2013).

La capacidad antifúngica y secuestrante de micotoxinas por parte de los productos fermentados con gránulos de kefir o con sus microorganismos, comenzó a ser estudiada más tardíamente. Los sobrenadantes de leche fermentada con kefir adicionados al caldo de cultivo en concentración del 10% v/v inhibieron completamente el crecimiento de los hongos y al 9% v/v redujeron el crecimiento del micelio de *A. flavus* en más de un 80% con respecto al control y su capacidad de producir aflatoxina B₁ (Ismail y col., 2011). El gránulo de kefir puede fermentar otros sustratos diferentes a la leche tales como el suero de quesería y el permeado de suero. Se ha demostrado que estos productos fermentados tienen actividad antifúngica contra *A. flavus*, *Penicillium crustosum*, *Trichoderma longibrachiatum* y *Rhizopus macrosporus* y prolongan la vida útil de alimentos como el alimento para pollos. Además, este alimento suplementado en relación 1/1 con los productos fermentados fue dos a cuatro veces más resistente a la contaminación fúngica que el alimento control y mantuvo los microorganismos provenientes del kefir después del almacenamiento 30 días a 20 °C. (León 2013; Londero y col., 2014) La adición del permeado de suero fermentado con gránulos al pan integral y la arepa antioqueña también aumentó su resistencia tanto a la contaminación fúngica natural como artificial con *A. flavus*, *A. parasiticus* y *P. crustosum* (Moure, 2013; León, 2013; Londero y col., 2014). Otro producto fermentado obtenido a partir de la fermentación de solución de “agua de panela colombiana” (extracto de caña concentrado), con gránulos de kefir de agua, produjo la inhibición del crecimiento de *A. ochraceus*, productor de ocratoxina A, una micotoxina presente frecuentemente en el café (Caro y León, 2014). Es importante resaltar que recientemente se ha aislado la bacteriocina F1 a partir de una cepa de *Lactobacillus paracasei* subsp. tolerans FX-6 aislado de kefir en el Tibet, China (Miao y col., 2014).

1.6 Estudios sobre protección de líneas celulares por BAL en presencia de micotoxinas.

Una vez conocido el efecto antifúngico de los metabolitos estudiados en medios de cultivo, se procedió a estudiar su efecto sobre las líneas celulares HepG2 y Caco-2TC7 y si la presencia de los microorganismos del kefir tenía efecto protector sobre las células.

Previamente se ha estudiado el efecto protector sobre la línea celular HepG2 con *Lactobacillus acidophilus* VM 20, que secuestra Ocratoxina A-OTA por encima del 95% y *Bifidobacterium animalis* VM 12, que reduce la concentración de Patulina-PAT en un 80%. En efecto se observó una reducción entre el 39 y 59% en la formación de micronúcleos inducidos por OTA y PAT y también se redujo significativamente la inhibición de la tasa de división celular (Fenech, 2000; Fuch y col., 2008;). En nuestro grupo se estudió la capacidad del suero de quesería fermentado con gránulos de kefir CIDA AGK10 para antagonizar la infección con *Salmonella* spp. y reducir la respuesta intestinal epitelial innata *in vitro*. Se pudo determinar que el suero fermentado interfirió con la capacidad de asociación e invasión de *Salmonella* spp. en células Caco-2/TC7 y que además redujo hasta el nivel basal la expresión del marcador CCL20 como respuesta al estímulo proinflamatorio sobre las células Caco-2 CCL20:luc (Londero y col., 2015).

1.7 Permeado de suero como sustrato de la fermentación

El permeado de suero, proveniente del lactosuero, es un subproducto de la industria láctea. Se estima que unas 450 mil toneladas de suero líquido se generan anualmente (Speranza, 2011). El componente principal del mismo, luego del agua, es la lactosa, que puede utilizarse como sustrato para su fermentación.

El suero de leche es el subproducto típico de la fabricación de quesos. Las características que posee lo transforman en un insumo de alto valor industrial por sus múltiples aplicaciones (Bulletin of The International Dairy Federation, 1987). Sin embargo, si el suero no es procesado y/o reciclado convenientemente, puede constituir una fuente peligrosa de contaminación ambiental, contribuyendo como efluente a la contaminación del suelo, aguas de napa y el aire en los alrededores de las plantas industriales. Se estima que unas 450 mil toneladas de suero líquido se generan anualmente (Speranza, 2011).

Anteriormente el suero era destinado principalmente a la alimentación animal como nutriente energético para el engorde de cerdos y otras especies (Ensminger y col. 1990). Actualmente, con el incremento en los niveles de producción, los avances tecnológicos en materia de industrialización, el crecimiento del mercado de consumo y la creciente necesidad de preservar el ambiente de agentes de contaminación, el suero está siendo reciclado por otras vías, con un mayor valor agregado (Yang y Silva, 1995). Los destinos posibles son la obtención de concentrados proteicos, producción de ácidos orgánicos destinados a la industria alimenticia, terapéutica y cosmética y obtención de lactosa cristalizada. Para disminuir el impacto ambiental de estos subproductos y dar un valor agregado, al suero se lo puede filtrar, para extraer las proteínas, obteniéndose un nuevo subproducto, el permeado de suero (PS), cuyo componente principal, luego del agua, es la lactosa que puede utilizarse como sustrato para su fermentación (Speranza, 2011).

El permeado de suero se produce por una serie de procesos de separación y concentración de las proteínas del suero. Los minerales restantes, así como la lactosa y el agua son entonces sometidos a procesos de concentración y cristalización antes de su transformación en polvo (Arla Foods ingredients, 2013). Este producto suele emplearse en alimentación animal (Schingoethe, 1993).

En Argentina se comercializa actualmente el PS en marcas como Perlac[®] (ésta comercializa un producto que se utiliza para la obtención de alimento balanceado) y Variolac[®], (éste puede utilizarse en productos de panadería, como optimizador del sabor dulce, en productos de confitería y recetas lácteas). Actualmente se promocionan las ventajas que ofrece el permeado de suero en panadería como asegurar la reacción de Maillard, lo cual conduce a una atractiva apariencia del producto, de color marrón- dorado. También se ha difundido su función como una fuente de hidratos de carbono en alimentos dietéticos, como un sustituto de la sal y potenciador del sabor. Además de permitir la sustitución de sal de hasta 100%, puede permitir una reducción de maltodextrina, sacarosa y dextrosa y su alto contenido de lactosa protege la calidad sensorial del alimento mediante la reducción de la pérdida de sabor durante el almacenamiento (Arla Foods ingredients, 2013).

1.8 Justificación del estudio.

El principal objetivo de este trabajo de tesis fue profundizar el conocimiento sobre el efecto del kefir sobre el crecimiento fúngico y el secuestro de micotoxinas. Es importante

resaltar que estos aspectos han sido poco estudiados con el kefir. También se buscó dilucidar si la acción frente a hongos y micotoxinas estaría asociada a la presencia del conjunto de todos los microorganismos presentes en el kefir o si podría atribuirse a alguno de sus microorganismos en particular. Dado que el kefir es un alimento natural, se podría utilizar para disminuir la presencia de hongos y micotoxinas en alimentos. Si se observara un efecto contra hongos y micotoxinas por parte del kefir entero, sería importante desde el punto de vista social, ya que es un producto artesanal de bajo costo y fácil acceso, que podría aportar a la prevención de micotoxicosis en humanos y animales, siendo aplicable en pequeños emprendimientos de producción de animales para consumo. Tanto el kefir entero como los microorganismos aislados del kefir, se podrían utilizar para el desarrollo de un nuevo producto con capacidad antifúngica y decontaminante de micotoxinas que además poseería actividad probiótica. Dado que el objetivo de esta línea de investigación es aportar a la protección de los alimentos y los consumidores contra la contaminación fúngica, sean animales o humanos, también se estudió la capacidad protectora de los microorganismos del kefir sobre las líneas celulares Caco2-TC7 y HepG2, en presencia de aflatoxina B₁, como un paso previo para los futuros estudios *in vivo*.

OBJETIVOS

e

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la potencialidad de los microorganismos del gránulo de kefir y sus metabolitos para inhibir el desarrollo de hongos toxicogénicos y para secuestrar micotoxinas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ⌞ Estudiar el efecto antifúngico de los productos fermentados con kefir sobre los hongos toxicogénicos.
- ⌞ Analizar el efecto que ejercen los ácidos orgánicos puros y en mezclas en concentraciones similares a las presentes en los productos fermentados con kefir, en la inhibición del crecimiento de hongos filamentosos toxicogénicos.
- ⌞ Indagar el efecto de los productos fermentados del kefir y de los ácidos orgánicos sobre la producción de micotoxinas por los hongos estudiados.
- ⌞ Evaluar la aplicación potencial de los microorganismos del kefir como un conservante natural sobre alimento para pollos.
- ⌞ Determinar la capacidad de los microorganismos totales del kefir y de microorganismos aislados de los mismos para capturar aflatoxinas bajo diferentes condiciones de cultivo.
- ⌞ Estudiar la capacidad protectora de los microorganismos totales del kefir sobre modelos celulares *in vitro*.

HIPÓTESIS

- 1 Los gránulos de kefir y sus microorganismos aislados podrían fermentar el permeado de suero reconstituido y a partir de ello se podría obtener una cinética de acidificación estandarizada.
- 2 Los gránulos de kefir podría ser sub-cultivados en permeado de suero e incrementarían su biomasa a través de los repiques sucesivos.
- 3 Los sobrenadantes provenientes del permeado de suero fermentado con gránulos de kefir tendrían la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos filamentosos.
- 4 La adición a los alimentos de permeado de suero fermentados con gránulos de kefir aumentaría su resistencia a la contaminación fúngica.
- 5 La aplicación de sobrenadantes obtenidos de permeado de suero fermentado con gránulos de kefir y/o de ácidos orgánicos puros en los medios de cultivo y el alimento para pollos, evitarían la producción de aflatoxinas al inhibir el crecimiento de los hongos estudiados.
- 6 Si se emplean dosis sub-letales de los productos fermentados y/o de los ácidos orgánicos puros en los medios de cultivo y en alimento para pollos, ocurriría una alteración en la capacidad de producción de aflatoxinas.
- 7 Los microorganismos totales del kefir y microorganismos aislados de los gránulos de kefir tendrían la capacidad de capturar micotoxinas *in vitro*.
- 8 La capacidad de capturar aflatoxina B₁ por parte de los microorganismos totales del kefir, las bacterias ácido lácticas y levaduras del kefir es determinada por el tipo de microorganismo y las condiciones experimentales.
- 9 La presencia de los microorganismos del kefir podría disminuir el daño celular causado por la aflatoxina B₁ sobre líneas celulares Caco-2TC7 y HepG2.

MATERIALES
Y
METODOLOGÍA

3.1 Especies fúngicas empleadas.

Fusarium graminearum Fg36, Fg44 y Fg48 fueron aislados y caracterizados en el CINDEFI-UNLP y fueron cedidos por la Dra. Teresa Alconada. *Aspergillus flavus* AFUNL5 fue aislado en la Cátedra de Microbiología de la Universidad Nacional del Litoral y cedido por el Dr. Juan Carlos Basílico; *A. parasiticus* CMUNLP7, *Penicillium sumatrense* CMUNLP3, *P. crustosum* CMUNLP4 (León, 2013) fueron aislado de un alimento cereal en la Cátedra de Microbiología de la UNLP. Todos los hongos se conservaron a 4°C en crioviales con agar agua en la Cátedra de Microbiología de la FCE-UNLP. Para cada experimento, se hicieron repiques a partir de los crioviales a tubos con agar papa inclinado PDA[®] (Merck, Darmstadt, Alemania) para *A. flavus* y *A. parasiticus* y agar SNA en pico de flauta (Spezieller Nährstoffarmer agar- Medio para favorecer la Esporulación) para *F. graminearum*.

3.2 Microorganismos aislados de gránulos de Kefir (MK).

Se emplearon microorganismos aislados de gránulos de kefir y caracterizadas en el CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos) de la UNLP: *Lactobacillus kefiri* CIDCA 8348, 83111, 8325 Y *L. kefiri* JCM5818; *L. plantarum* CIDCA 83114, 8327, 8329, 8318 y 8316; *Saccharomyces cerevisiae* 81103 y 8116, *Kluyveromyces marxianus* 8154, *S. lipolytica* 8112, *Saccharomyces boulardii* CINDEFI y *K. lactis* CINDEFI (Garrote, 1999). Las cepas se conservan en leche a -20°C y para efectuar los experimentos se reactivaron mediante dos pasajes consecutivos cultivándolas por 24 horas a 30°C en caldo MRS (DIFCO[®], Beauvais, Francia), antes de cultivarlas en Permeado de suero (PS).

3.3 Gránulos de Kefir.

Se emplearon gránulos de kefir CIDCA AGK1, caracterizados en el CIDCA, UNLP (Garrote, 1999; Garrote y col., 2000) y pertenecientes a la colección de gránulos del grupo de Bacterias Lácticas. Los gránulos se encuentran almacenados en leche entera a -20 °C. Los gránulos se reactivaron mediante dos pasajes sucesivos a 30 °C en leche UHT (Sancor, Santa Fe, Argentina). Una vez reactivados, se inocularon al 10% p/v en permeado de suero (PS) estéril y se incubaron a 30 °C. A partir de los productos

fermentados obtenidos, se obtuvieron los Sobrenadantes Libres de Células (SLC) requeridos para los ensayos.

3.4 Medios de cultivo y soluciones.

La composición de los medios de cultivo, soluciones para dilución y colorantes se detallan en el Anexo 1. Para el recuento de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) y levaduras se emplearon medios MRS[®] (DIFCO, Beauvais, Francia) e YGC[®] (BIOKAR DIAGNOSTICS, Beauvais, Francia), respectivamente.

El Permeado de Suero se adquirió en la empresa ILOLAY, Santa Fé, Argentina y en la empresa Arla Foods, CABA, Argentina y se preparó reconstituyendo al 50% en agua destilada y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Los hongos filamentosos se cultivaron en Agar Agua, Agar Papa glucosa PDA[®] (BIOKAR DIAGNOSTICS, Beauvais, Francia), Agara SNA (Spezieller Nährstoffarmer agar-Medio para favorecer la Esporulación) y Agar MEA (Extracto de Malta). El agar agua, SNA y MEA se prepararon a partir de los componentes (León et al, 2012; León, 2013), mientras que los demás medios de cultivo se prepararon siguiendo las indicaciones de los fabricantes. Para diluir los conidios se empleó solución dispersante de esporas y para las diluciones del kefir se empleó agua de triptona al 0,1% p/v. Todos los medios de cultivo y soluciones se prepararon con agua destilada y se esterilizaron en autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

3.5 Curvas de acidificación con gránulos de kefir o MK.

Para realizar la curva de acidificación de PS o leche, el sustrato se inoculó con gránulo CIDCA AGK1 al 10% y se incubó a 30°C. Se tomaron lecturas periódicas del pH del producto durante la fermentación con un pHmetro ALTRONIX TPX-III (Altronix[®], Taiwan) hasta alcanzar los pH deseados (entre 4,5 - 3,3). Para realizar la curva de acidificación del PS fermentado con microorganismos aislados del kefir, éstos se activaron mediante dos pasajes consecutivos en caldo MRS (DIFCO[®], Beauvais, Francia). Se inocularon 100 µl/5 ml de PS estéril; se incubaron a 30°C y se tomaron medidas de pH hasta alcanzar su pH final, luego de 24 o 48 horas de incubación. Las curvas de acidificación se construyeron graficando pH vs. Tiempo.

3.6 Obtención de los microorganismos de los productos fermentados con gránulos de kefir y con MK.

Los productos fermentados se prepararon como se describió en el apartado anterior. Para los productos fermentados con gránulo de kefir, al finalizar la fermentación, los gránulos se separaron del producto fermentado empleando un colador de malla de 1 mm². Luego de ser colado, los microorganismos presentes en los productos fermentados se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos en centrífuga Rolco[®]. Se consideró que el pellet de microorganismos obtenidos a partir del PS fermentado contenía los microorganismos representativos del gránulo de kefir CIDCA AGK1 o de los MK. Este pellet se utilizó para los posteriores ensayos de desafío entre estos y la aflatoxina B₁.

3.7 Preparación del inóculo de conidios.

Una vez inoculados los hongos en sus respectivos medios (PDA o SNA) se incubaron durante 7 días a 30 o 25°C. Luego de la incubación se agregaron 9 ml de solución dispersante de esporas y raspando suavemente la superficie del cultivo con ansa para desprender los conidios del agar. Se consideró esta solución como la dilución 1/10 y a partir de ella se realizaron diluciones seriadas hasta 1/1000. El número de conidios se obtuvo a partir de recuentos en cámara de Neubauer, previa tinción de los conidios con Tripán Blue. La solución de trabajo se obtuvo ajustando la concentración a 5x10⁵ conidios/ml y se preparó el mismo día del ensayo (Molina y Giannuzzi, 1996; León y col., 2012). Los recuentos se verificaron a través de recuentos en placa con medio MEA.

3.8 Obtención de sobrenadantes libres de células (SLC) de permeado de suero fermentado con gránulos CIDCA AGK1 (PSFG).

Los gránulos de kefir CIDCA AGK1 se inocularon al 10% p/v en PS estéril y se incubaron a 30 °C hasta alcanzar el pH final deseado, el cual se midió en un pHmetro Altronix TPX-III[®] (Altronix, Taiwan). Los gránulos de kefir se separaron del PSFG mediante un colador de malla de 1 mm² y se conservaron mediante repiques sucesivos en PS estéril. Los microorganismos presentes en el producto fermentado se precipitaron mediante centrifugación a 3000 rpm durante 15 min en centrífuga Rolco[®] (Rolco, Buenos Aires, Argentina). El SLC se obtuvo mediante filtración con membrana estéril

de 0,22 µm de tamaño de poro (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

3.9 Determinación de lactosa en PS.

Se determinaron los azúcares reductores expresados como porcentaje de lactosa, según la técnica de Nelson-Somogyi (Collmer, Ried, y Mount, 1988). La reacción se hizo en tubos de ensayo con tapones de vidrio; en cada tubo se adicionaron 2 ml de reactivo de cobre y 2 ml de solución de PSFG o de PSFM, se introdujeron en un baño de agua hirviendo durante 10 min y se enfriaron 5 minutos en agua corriente. Se agregó 1 ml de reactivo de arsenomolibdato, se mezcló, se llevó a un volumen definido de 10 ml y se midió la absorbancia a 520 nm. Para la determinación de la concentración de la muestra, se preparó una curva patrón de lactosa a las siguientes concentraciones: 0, 50, 150, 300 y 400 µg/ml (Southgate, 1976).

3.10 Determinación de Nitrógeno total en PS.

Se determinó por el método de micro Kjeldahl en un equipo micro Kjeldahl VELP Scientifica (Italia). Para la digestión se empleó como catalizador 4 g de mezcla de CuSO₄ (J.T.BAKER®, USA), K₂SO₄ (J.T.BAKER®, USA), y 10 ml de H₂SO₄ concentrado (96%) (Merck®, Germany) y se adicionaron 5 ml de muestra, calentando a 420 °C por 45 minutos. El Nitrógeno amoniacal se destiló en medio alcalino sobre 50 ml de H₃BO₃ (Merck®, Darmstadt, Germany) al 4% y el borato de amonio obtenido se tituló con HCl 0,1N (Merck®, Darmstadt, Germany). Como blanco de reactivos se empleó papel de filtro. La concentración de Nitrógeno se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\%N = [14 \text{ mg/meq} (\text{VolHCl}_m - \text{VolHCl}_b) * N * 100] / w \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Donde:

%N= Porcentaje de Nitrógeno total

N= Normalidad del titulante (HCl 0,1N)

14 mg= peso en mg de un miliequivalente de Nitrógeno

VolHCl_m= Volumen en ml de HCl 0,1 N empleado en la titulación de la muestra

VolHCl_b= Volumen en ml de HCl 0,1 N empleado en la titulación del blanco de reactivos

w= Peso de la muestra en miligramos.

(ICONTEC, 1994; AOAC, 1997).

3.11 Determinación de cenizas totales en PS.

Las muestras se pesaron a la décima de mg en una cápsula de porcelana previamente calcinada a 500 - 550°C, enfriada en desecador y pesada al tomar temperatura ambiente. Como eran muestras líquidas, se evaporaron hasta sequedad y se continuó con la calcinación en mufla a 500-550°C hasta cenizas de color gris claro y peso constante. Éstas se enfriaron en desecador y se pesaron al alcanzar la temperatura ambiente.

3.12 Ensayos de inhibición fúngica.

Se estudió la capacidad inhibitoria de los ácidos orgánicos láctico y acético puros y sus mezclas y de los SLC PSFG sobre los hongos filamentosos, a fin de determinar las concentraciones fungicidas mínimas y el efecto de las dosis sub-letales sobre el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas. Se utilizaron dos métodos: el ensayo de inhibición de la germinación de conidios y el ensayo de inhibición en placa.

3.12.1 Estudio del Porcentaje de Inhibición de la germinación de los conidios.

Se estudió la capacidad para reducir la germinación de los conidios, por los sobrenadantes libres de células de permeado de suero fermentado con gránulo de kefir (SLC PSFG), según la técnica de reducción de la germinación de los conidios en placas estériles de microdilución (96 fosas) (Brand®, Wertheim, Alemania) (Lavermicocca y col., 2000; Gerez y col., 2009). Se agregaron 10 µl de una suspensión con 5×10^4 conidios/ml de cada hongo a fosas con 190 µl del SLC PSFG a evaluar o con distintas concentraciones de ácidos láctico y/o acético adicionadas a caldo extracto de malta (MEC). El control positivo consistió en SLC de PS sin fermentar que fue centrifugado y esterilizado por microfiltración al igual que los SLC provenientes de las fermentaciones o el medio MEC, sin ácidos orgánicos.

Una vez inoculado cada tratamiento, se incubaron las placas a 30°C por 48 h. Se leyó la DO de los tratamientos en un lector de microplacas RT-2100C (Pioway, Nanjing,

China) a una longitud de onda de 580_{NM}. La actividad antifúngica de los SLC o de los ácidos fue expresada como el porcentaje de inhibición de la germinación (%IG) medido a una DO_{580NM} comparado con el control, mediante la fórmula:

$$\%IG = [(DO_{cp} - DO_{tto}) / DO_{cp}] \times 100 \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Donde:

DO_{cp}: Densidad óptica del control positivo

DO_{tto}: Densidad óptica del tratamiento

Una inhibición de la germinación de los conidios mayor al 20% se consideró positiva, la inhibición fue baja entre 20 y 40%, media entre el 40% y 70% y fuerte por encima al 70% (Gerez y col., 2009). Los ensayos fueron realizados por quintuplicado, y se hicieron dos repeticiones de cada experimento.

Una vez se determinaron los tratamientos con mayor actividad antifúngica, se alcalinizaron los SLC a valores de pH de 4,0; 4,5 y 5,0 con NaOH 0,1N y se re-evaluó su efecto inhibidor.

3.12.2 Estudio de inhibición fúngica en placa por difusión.

El medio MEA estéril y fundido se mezcló en cabina de flujo laminar con diferentes concentraciones de SLC de PSFG o de ácidos orgánicos puros (individuales o en mezclas), se homogenizó manualmente y se distribuyó en placas de petri, dejando solidificar. El pH final de la mezcla se determinó en un pHmetro Altronix TPX-III[®] (Altronix, Taiwan).

- Inhibición en placa por difusión con SLC de PSFG.

Se adicionaron SLC PSFG obtenidos a diferentes valores de pH (4,0 y 3,5) en concentraciones del 25; 50; 55; 60; 62,5; 65; 70 y 75% v/v al medio de cultivo, según el ensayo. Se utilizaron diferentes controles: MEA sin adición de SLC; MEA acidificado artificialmente con HCl 3M hasta el mismo pH que el PSFG empleado; MEA

acidificado con ácidos orgánicos en la misma concentración determinada para el PSFG empleado y llevado al mismo pH final de éste; MEA agregado con el PS sin fermentar.

- Inhibición en placa por difusión con ácidos láctico y acético puros.

Se evaluaron diferentes concentraciones de ácidos orgánicos láctico (Carlo Erba, Milan, Italia) y acético (Merck, Darmstadt, Alemania) para determinar la concentración fungicida (CFM) individual tanto para *F. graminearum* como *A. parasiticus* CMUNLP7. A partir de las CFM establecidas, se hicieron mezclas reduciendo gradualmente la concentración de las CFM 0,5; 0,25; 0,12 y 0,06. La aplicación de mezclas buscó determinar tanto aquella de menor concentración con actividad fungicida como las mezclas sub-letales y su efecto sobre la producción de aflatoxina AFB1. Para ello se prepararon soluciones madre de ácidos puros (10% v/v) en agua destilada, que luego fueron agregadas al medio MEA fundido tal como se describió previamente.

Para ambos estudios (inhibición con SLC PSFG o con ácidos orgánicos puros), se inocularon 10 µl de la suspensión de 5×10^5 conidios/ml en el centro de las placas, dejando secar la gota antes de llevar a incubación a 30 °C. Dado que los hongos crecen de forma circular, se midió el crecimiento del hongo tomando diariamente 4 medidas de su diámetro con un calibre, hasta que el hongo invadiera toda la placa de Petri (Horner y Anagnostopoulos, 1973). En caso de no observarse crecimiento, se revisaron diariamente las cajas durante los 30 días del ensayo (López-Malo y col., 2007).

- Parámetros de crecimiento

Para cada tratamiento se graficó la curva de crecimiento fúngico como diámetro (mm) versus tiempo (horas).

- **Determinación de la cinética de crecimiento fúngico.**

A partir de las curvas de crecimiento se estableció el tiempo que requirió el hongo para alcanzar el diámetro total (80 mm) de la caja de Petri.

- **Cálculo de la tasa de crecimiento (K_D) (mm/h).**

A partir de la región lineal de la curva de crecimiento, se calculó la regresión lineal, cuya pendiente corresponde a la tasa de crecimiento K_D (mm/h), empleando el software Sigma Plot 9,0[®] (León y col., 2012).

- **Cálculo de fase de latencia (Lag) (h).**

La fase Lag es el tiempo (en horas) necesario para que el hongo crezca más allá de la zona inicial de inoculación. A partir de la ecuación de la recta obtenida mediante la regresión lineal, se calculó la fase de latencia Lag (h):

$$\text{Lag} = \{(D_0 - b) / K_D\} \quad \text{Ecuación 3.3}$$

D_0 = Diámetro de inóculo inicial del hongo

b = Corte de la recta en el eje Y

K_D = Pendiente de la recta (Molina y Giannuzzi, 1999; León y col., 2012)

- **Cálculo del índice de inhibición de la tasa de crecimiento (%IIK_D) y relación fase de latencia del tratamiento/fase de latencia control (LagT/LagC).**

Los parámetros de crecimiento obtenidos para cada tratamiento se relacionaron con los correspondientes a los controles, mediante las siguientes ecuaciones.

$$\%IIK_D = [(K_{DC} - K_{DT}) / K_{DC}] \times 100 \quad \text{Ecuación 3.4}$$

Donde K_{DC} y K_{DT} son la tasa de crecimiento del control y del tratamiento respectivamente. Cuando la acción inhibitoria tiene lugar, K_{DT} es inferior a K_{DC} y entonces %IIK_D es superior 0, entre 0 - 100% (donde 0% es una velocidad de crecimiento igual a la del medio MEA sin adicionar y 100% es una velocidad igual a 0).

La relación entre ambas fases de latencia también se expresó como LagT/LagC.

Donde LagT y LagC son la fase de latencia del tratamiento y del control respectivamente. Cuando la acción inhibitoria tiene lugar, la relación es superior a 1.

3.12.3 Determinación de la concentración fungicida mínima (CFM)

Es la mínima concentración de SLC PSFG que produce la muerte del hongo, o sea la concentración a la cual no tiene lugar el crecimiento en el medio de cultivo. Con el fin de corroborar que determinada concentración era fungicida, se tomó la zona de inóculo de los tratamientos en los cuales no hubo crecimiento y se repicó en agar MEA sin adición del compuesto inhibitorio. Si el hongo crecía, se consideraba que dicha concentración era fungistática; de lo contrario, se consideraba fungicida.

3.12.4 Determinación de la concentración fungicida mínima (CFM) con ácidos láctico y acético puros.

La concentración fungicida mínima (CFM) de los ácidos láctico y acético aplicados en forma individual y en mezclas binarias se definió como la concentración mínima probada que inhibió el crecimiento de los hongos estudiados durante 30 días.

Se realizaron ensayos de difusión en agar e inhibición de la germinación como se describen arriba, donde se agregaron diferentes concentraciones de ácido láctico y acético sobre *F. graminearum* (Tabla 3.1 - Parte A) y *A. parasiticus* (Tabla 3.1 - Parte B).

Tabla 3.1. Concentraciones de ácidos láctico y acético utilizados en los ensayos de inhibición sobre *F. graminearum* (Parte A) y *A. parasiticus* CMUNLP7 (Parte B).

Parte A:

Ácido acético (mM)	Ácido láctico (mM)
7,79	33,21
10,06	56,29
15,71	88,91
19,84	122,33
25,47	139,59
30,89	

Parte B:

Ácido acético (mM)	Ácido láctico (mM)
17,32	108,38
24,25	162,58
27,71	216,77
31,17	270,96
34,64	325,15
38,10	379,34
	433,54
	460,63

Una suspensión de 5×10^5 conidios/ml fue inoculada en el centro de las placas con medio MEA con diferentes concentraciones de ácidos láctico y acético puros. Se realizaron curvas de crecimiento y regresiones lineales. A través de las regresiones, se calcularon los parámetros de crecimiento. Las concentraciones de ácidos calculadas y utilizadas se corroboraron mediante HPLC.

3.12.5 Determinación de la concentración fungicida mínima (CFM) con mezclas de ácidos láctico y acético.

Una vez determinada la CFM de los ácidos orgánicos puros individuales, se usaron estos datos para seleccionar las concentraciones de ácidos láctico y acético de las mezclas de ácidos. Se utilizaron fracciones de la CFM de cada hongo (0,06; 0,12; 0,25 y 0,5 veces la CFM determinada) (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Mezclas de ácidos láctico y acético utilizados en los ensayos de inhibición fúngica realizados sobre *F. graminearum* (Fg44, Fg36 y Fg48) y *A. parasiticus* CMUNLP7.

Mezclas de ácidos láctico y acético (mM)	
<i>F. graminearum</i>	<i>A. parasiticus</i>
1,19A + 5,33L	2,25A + 27,10L
1,19A + 10,67L	2,25A + 55,55L
1,19A + 22,23L	2,25A + 115,16L
1,19A + 44,46L	2,25A + 230,32L
2,38A + 5,33L	4,50A + 27,10L
2,38A + 10,67L	4,50A + 55,55L
2,38A + 22,23L	4,50A + 115,16L
2,38A + 44,46L	4,50A + 230,32L
4,96A + 5,33L	9,53A + 27,10L
4,96A + 10,67L	9,53A + 55,55L
4,96A + 22,23L	9,53A + 115,16L
4,96A + 44,46L	9,53A + 230,32L
9,92A + 5,33L	19,05A + 27,10L
9,92A + 10,67L	19,05A + 55,55L
9,92A + 22,23L	19,05A + 115,16L
9,92A + 44,46L	19,05A + 230,32L

Las concentraciones de ácidos orgánicos de las soluciones de trabajo fueron corroboradas por HPLC.

3.13 Análisis por HPLC de los ácidos láctico y acético en los SLC y en los alimentos adicionados de productos fermentados.

La concentración de ácido láctico y ácido acético se determinó en el SLC del producto fermentado. Para determinar los ácidos de los alimentos adicionados de producto fermentado, se diluyó 1/10 el alimento en agua bidestilada, se homogenizó en stomacher (Laboratory Blender Stomacher 400[®], Inglaterra) y se filtró con filtros de 0,22 μm (Sigma-Aldrich[®], USA). Los SLC se analizaron por HPLC (Agilent Technologies[®] series 1200, Santa Clara CA, USA), columna de intercambio iónico Aminex HPX-87H (Bio-Rad[®], Hercules, USA). Se empleó fase móvil H_2SO_4 0,009N (Merck[®], Darmstadt, Alemania) a un caudal de 0,6 ml/min, con detector ultravioleta a longitud de onda de 214 nm (Garrote, 1999). Se hicieron curvas patrón de ácido acético (Merck[®], Darmstadt, Alemania) de 25, 50, 100, 200, 700, 1500 y 3000 ppm y de ácido láctico (Carlo Erba[®], Milán, Italia) de 500, 1000, 4000, 8000, 10.000, 14.000 y 18000 ppm.

3.14 Cálculo de la concentración de ácidos orgánicos no disociados

La concentración de los ácidos no disociados se hizo con la siguiente ecuación.

$$HA = \frac{([Ca] \times [H^+])}{([H^+] + K_a)} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

[HA]: concentración total de ácido no disociado (mM)

[Ca]: concentración total de ácido en el medio de cultivo (mM)

[H⁺]: concentración protones

K_a: Constante de equilibrio (pK_{a.láctico}:3,79; pK_{a.acético}: 4,75).

3.15 Cálculo de la Concentración Inhibitoria Fraccionaria (CIF).

Las diferentes CFM halladas se transformaron en concentración inhibitoria fraccionaria (CIF), según Davidson y Parish (1989) y López-Malo y col. (2007), según las siguientes fórmulas.

$$CIF_{\text{láctico}} = (\text{CIM ácido láctico en presencia de ácido acético}) / (\text{CIM láctico solo})$$

Ecuación 3.6

$$CIF_{\text{acético}} = (\text{CIM ácido acético en presencia de ácido láctico})/(\text{CIM acético solo})$$

Ecuación 3.7

La sinergia generada por la mezcla de ácidos puede ser expresada en forma matemática por medio de la concentración inhibitoria fraccionaria CIF, que se calcula a partir de valores de CIM para cada uno de los ácidos orgánicos como sigue:

$$CIF_{\text{índice}} = CIF_{\text{láctico}} + CIF_{\text{acético}} \quad \text{Ecuación 3.8}$$

Esta relación puede ser interpretada de la siguiente manera:

- Si la relación entre el ácido láctico y acético es aditivo, la suma de los valores de CIF en la ecuación 3.6 es 1.
- Asimismo, si la interacción entre el ácido láctico y acético es sinérgica la suma esperada de los CIF es inferior a 1.
- La relación es antagónica si la suma de las fracciones es mayor a 1 (Adams y Hall, 1988; Dickson y Maynard, 1992; Rubin, 1978; Berenbaum, 1977).

3.16 Preparación de PS acidificados artificialmente con ácidos orgánicos puros (láctico y acético) y con HCl

Se acidificó el permeado de suero (PS) (ILOLAY[®], Santa Fé, Argentina) con ácido láctico y acético, según las concentraciones determinadas en esta tesis por HPLC en permeado de suero fermentado con gránulo CIDCA AGK1 (PSFG). Se adicionó la concentración observada de ácido láctico (Carlo Erba[®], Milán, Italia) y de ácido acético (Merck[®], Darmstadt, Alemania) y se ajustó el pH a 3,5 con HCl 3M (Merck[®], Darmstadt, Alemania). La acidificación con ácido fuerte se hizo con HCl 3 M (Merck[®], Darmstadt, Alemania) hasta pH 3,5. El PS adicionado con ácidos orgánicos y con HCl se centrifugó y esterilizó por filtración. Todos los SLC estériles obtenidos se almacenaron a -20 °C hasta su posterior empleo para determinar su potencial antifúngico.

3.17 Alimento para pollos

Se empleó alimento balanceado NUTRISUR BB[®] (Nutrisur, Buenos Aires, Argentina), en presentación de paquetes de 25 kg. Su composición según indica el fabricante, consta de harina de girasol, harina de soja, poroto de soja desactivado, trigo, sorgo, afrechillo de trigo, gluten, cebada, harina de carne, harina de pescado, metionina, sal, coccidiostato, antioxidante (BHT), vitaminas A, D3, E, B2, B6, K3, B1, B12, ácido nicotínico, ácido fólico, pantotenato de Ca, biotina, colina, Mn, Zn, Fe, Cu, I y Se (Nutrisur). El alimento se compró en el mismo distribuidor cada vez que se iba a efectuar un experimento, corroborando que el alimento estuviera dentro de la fecha de vencimiento.

3.18 Adición al alimento para pollos de PSFG.

El PSFG se separó de los gránulos mediante un colador y se adicionó en proporción 100, 65, 50 y 25% v/p al alimento para pollos bebe Nutrisur[®], mezclándose hasta quedar bien homogenizado. Se utilizaron dos controles, alimento adicionado al 100% v/p con agua destilada o adicionado al 100% v/p con PS sin fermentar. El alimento húmedo se distribuyó homogéneamente en bandejas de acero inoxidable formando una película de aproximadamente 0,5 cm de espesor y se sometió a secado en estufa de convección forzada San Jor[®] (San Jor, Buenos Aires, Argentina) a 50°C, hasta alcanzar una actividad acuosa (a_w) de 0,95. Durante el secado se tomaron muestras (dejándolas alcanzar 24 °C previamente) para determinar la a_w en un equipo AQUALAB[®] (AQUALAB, USA). Una vez terminado el secado, el alimento se enfrió en un desecador con sílica gel y se fraccionó en bolsas de de polietileno de 50 g en bolsas, que se emplearon en los ensayos posteriores.

3.18.1 Resistencia del alimento adicionado de PSFG a la contaminación artificial.

El alimento contenido en cada una de las bolsas se inoculó mediante aspersión con una solución de esporas de concentración 1×10^4 conidios/ml de *A. parasiticus* CMUNLP7, adicionando 0,5 ml de esta solución por cada 50 g de muestra (Gerez y col., 2009). Por último las bolsas se sellaron y se incubaron en estufa a 25°C. El alimento contaminado se observó cada día y se tomó el tiempo que tardó en hacerse visible el crecimiento

fúngico. Este se calculó en días y se comparó con el alimento control (sin adición de PSFG). Para facilitar la comprensión, en la Figura 3.1 se presenta esquema experimental seguido para este ensayo.

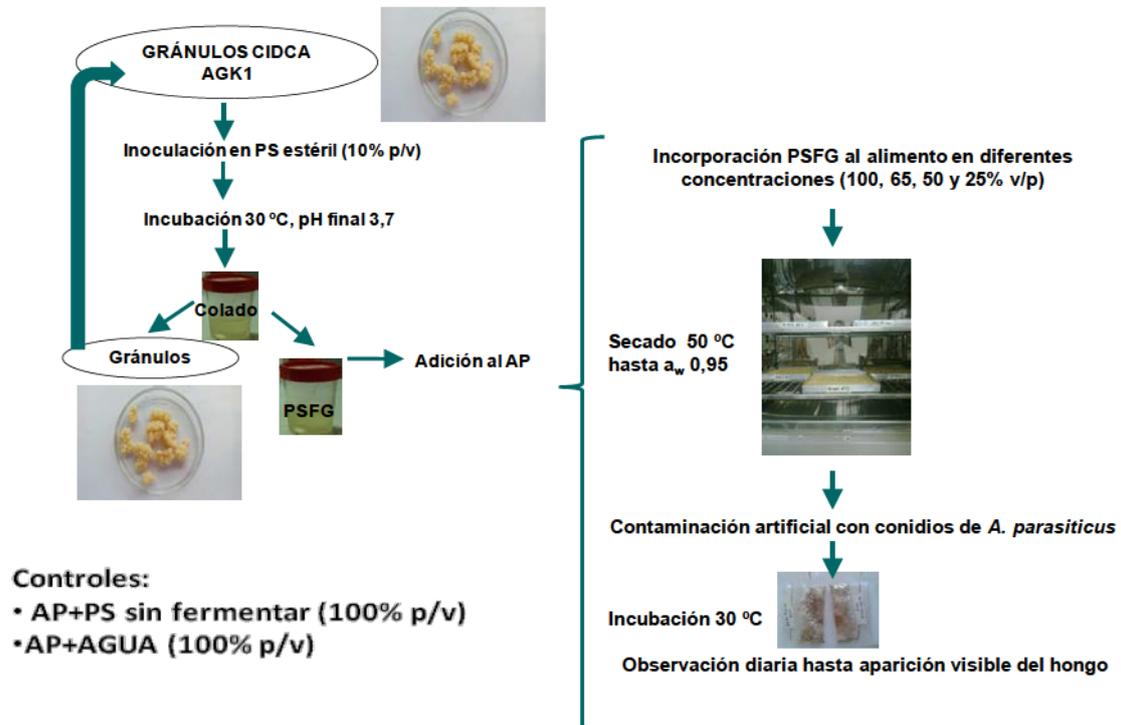


Figura 3.1. Esquema experimental del ensayo de resistencia del alimento adicionado de PSFG a la contaminación artificial. AP: alimento para pollos.

3.18.2 Recuento de hongos en el alimento para pollos

Se realizaron recuentos de hongos en agar DRBC a los días 0, 15 y 30 días de almacenamiento del alimento adicionado con 100% v/p de PSFG, 100% v/p de agua destilada y 100% v/p de PS sin fermentar. Se tomaron 5 g del alimento para pollos y se diluyeron en 45 ml triptona 0,1%. Se realizaron las diluciones seriadas necesarias. A partir de estas, se tomaron alícuotas de 100 μ l y se adicionaron a placas de agar DRBC. Se distribuyeron con perlas estériles. Se contaron los hongos luego de las 48 horas de incubación.

3.19 Determinación de la producción de micotoxinas.

- En los medios de cultivo.

Se estudió si la variación en las concentraciones sub-letales de PSFG o mezclas de ácidos orgánicos incidía en la concentración de micotoxinas producida por el hongo

filamentoso estudiado, extrayendo aflatoxinas o zearalenona, según el hongo, de los medios de cultivo. Para cada tratamiento se fragmentó el agar con el hongo cultivado, en porciones pequeñas, dentro de un erlenmeyer. Se agregaron 125 ml de metanol (JTBaker, Center Valley, USA) al 70% v/v por cada 25 g de muestra y perlas de vidrio para favorecer la extracción y se llevó el erlenmeyer a agitación. La muestra se filtró con papel de filtro Whatman N°1 y el filtrado se almacenó en freezer a -20°C, hasta hacer la determinación de aflatoxinas o zearalenona. La concentración de micotoxina en cada muestra se determinó mediante el método de Kit Inmunológico para prueba de ELISA VERATOX[®] (Neogen, Leshar Place, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El procedimiento se realizó cuando los hongos en cada tratamiento invadieron la totalidad de la placa. Las muestras también fueron medidas mediante HPLC.

- En el alimento para pollos.

Se contaminaron el alimento para pollos con el hongo y a los 7 y 27 días de transcurrida dicha contaminación, se hacía extracción de aflatoxinas para el total de los tratamientos. Esto se hizo para poder comparar la concentración de aflatoxinas que en ese momento se había alcanzado para cada tratamiento. La concentración de micotoxina en cada muestra se determinó mediante el método de Kit Inmunológico para prueba de ELISA VERATOX[®] (Neogen, Leshar Place, USA) y mediante HPLC.

3.20 Extracción de aflatoxina B₁ para realizar cuantificación mediante HPLC.

Una vez observada la aparición visible del hongo sobre el alimento para pollos, se realizó la extracción de aflatoxina B₁ presente en el alimento para pollos. El alimento (50 g) se mezcló con 100 ml de metanol 80% y 5 g de NaCl. La mezcla se licuó a máxima potencia por 1 minuto, luego se filtró con papel de filtro Whatman y se recolectó el filtrado en un recipiente limpio. 10 ml del filtrado se mezcló con 40 ml de agua MiliQ. Se tomaron 10 ml de esta mezcla y se pasaron por la columna de inmunoafinidad AflaTest Vicam[®]. Se lavó la columna con 10 ml de agua miliQ. Se eluyó la micotoxina con 1 ml de metanol puro y 1 ml de agua MiliQ. Se tomaron 20 µl y se inyectaron en el HPLC. En la Figura 3.2 se muestra el procedimiento realizado.



Figura 3.2. Esquema experimental de la extracción de aflatoxina B₁ del alimento para pollos.

3.21 Cuantificación de aflatoxina B₁:

La determinación de aflatoxina B₁ se realizó por HPLC, previa extracción de la toxina mediante columnas de inmunoafinidad (Aflatest, VICAM[®]). Las muestras fueron derivatizadas, filtradas y analizadas por HPLC (Waters 717 plus Autosampler) con detector de fluorescencia. Las separaciones cromatográficas fueron llevadas a cabo con una columna C18 de fase reversa (150 x 4,6 mm, 5 µm tamaño de partícula). La fase móvil utilizada fue una mezcla de agua/acetonitrilo/metanol (70:17:17, v/v/v) a un flujo de 1,0 mL/min. La cuantificación de AFB₁ fue realizada midiendo el área de los picos y extrapolando con una curva de calibración previamente obtenida usando soluciones estándares de concentraciones conocidas (BIOPURE[®]) mediante el uso de software Empower[®]. El límite inferior de cuantificación de este equipo es de 25 ppb y el límite de detección de 10 ppb.

3.22 Determinación de la concentración de aflatoxina B₁ mediante método inmunológico (VERATOX[®])

Esta prueba es un ELISA directo competitivo que proporciona concentraciones exactas en partes por billones (ppb). La aflatoxina libre en la muestra y los controles compiten con la toxina-enzima marcada (conjugado) para los sitios de unión al anticuerpo. Después de una etapa de lavado, el sustrato reacciona con el conjugado de la enzima ligada para producir color azul. Se utiliza un lector de microplacas para medir densidades ópticas. Las densidades ópticas de los controles, forman una curva de

calibración, y las densidades ópticas de la muestra se interpolan en la misma curva para calcular la concentración exacta de aflatoxina.

Este método permite cuantificar aflatoxinas concentraciones entre 0 y 50 ppb. En pozos sin anticuerpo, se conjugaron 100 μ l de cada muestra de aflatoxina (extraída con metanol 70% y filtradas con papel de filtro), con una enzima (peroxidasa de rábano, utilizada como un antígeno). Un volumen de cada mezcla (100 μ l) se transfirió a pozos que contienen anticuerpos adheridos a la superficie inferior, donde los conjugados se unieron a los anticuerpos específicos a las aflatoxinas. El exceso de aflatoxinas y enzimas conjugadas pero no fijadas a los anticuerpos fueron desechadas mediante cinco lavados sucesivos con agua destilada. Luego se adicionó una segunda enzima que actúa como enzima fijadora, que cambia de color las muestras. La intensidad del color depende de la cantidad de enzima conjugada fijada a los anticuerpos, un color oscuro indica menor presencia de aflatoxinas en las muestras. Se agregó finalmente una solución que detiene la reacción y después de 2 o 3 minutos se leyó la absorbancia de las muestras a 650 nm (Neogen Corporation[®], 2009).

3.23 Captura de aflatoxina B₁ por microorganismos totales del granulo de kefir CIDCA AGK1 y con microorganismos aislados del granulo de kefir

3.23.1 Preparación de la solución de aflatoxina B₁.

a) Preparación de la solución madre y la solución de trabajo de aflatoxina.

Para preparar la solución madre se utilizó aflatoxina B₁ (SIGMA[®]) en estado sólido. Se disolvieron 10 mg en 5 ml de metanol (J.T.BAKER[®], Mallinckrodt, Alemania), alcanzando una concentración final aproximada de (2000 ppm) y se tomaron 500 μ l llevando hasta 100 ml, para alcanzar una concentración final de 1/100 ml (10 ppm). Para determinar el coeficiente de absortividad, se preparó una solución de H₂SO₄ (Merck[®], Darmstadt, Alemania) 0,018 N y tres soluciones de K₂Cr₂O₇ (J.T.BAKER[®], Mallinckrodt, Alemania) en concentraciones 0,25; 0,125 y 0,0625 mM. Para ello el K₂Cr₂O₇ se secó en estufa a 100 °C durante 20 horas y el pesado se realizó en balanza analítica con sensibilidad de 0,001 mg. Se determinó la absorbancia (A) de las tres soluciones de K₂Cr₂O₇ a 350 nm, contra un blanco de H₂SO₄ 0,018 N, en un

espectrofotómetro con celda de cuarzo. Para cada concentración se calculó la absorbancia $\epsilon = (A \times 1000/\text{mM})$ y se promediaron los tres valores para obtener la ϵ media. Se calculó también el factor de corrección (CF) para el instrumento y las celdas mediante la ecuación siguiente.

$$\text{CF} = 3160/\epsilon \quad \text{Ecuación 3.9}$$

Donde 3160 es el factor de corrección para las soluciones de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. El valor promedio de ϵ fue 3040,5 y el CF 1,04, quedando dentro del rango de aceptación mayor a 0,95 y menor a 1,05, según se muestra en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Absorbancia y ϵ obtenidos para las tres concentraciones de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

$[\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7]$	A	ϵ
0,25	0,7856	3142
0,125	0,3764	3011,2
0,625	0,1855	2968
PROMEDIO $\epsilon=3040,5$, CF= 1,04		

b) Determinación de la concentración de aflatoxinas.

Se determinó la absorbancia (A) de la solución de aflatoxina 10 ppm a 360 nm y se calculó la concentración real de la solución mediante la fórmula:

$$\epsilon = (AxMWx1000)/\mu\text{g aflatoxina/ml.} \quad \text{Ecuación 3.10}$$

Donde MW es el peso molecular de la aflatoxina AFB1 (312) (AOAC,1984).

$$[\text{AF B}_1] = (0,5065 \times 312 \times 1000) / 21800 = 7,25 \mu\text{g/ml: } 7,25 \text{ ppm.}$$

Multiplicado por el FC dio una concentración de 7,54 ppm o 7540 ppb.

La concentración real de aflatoxina B₁ fue corroborada mediante lectura en HPLC utilizando un patrón de aflatoxina B₁ (BIOPURE®).

A partir de la solución madre, se prepararon la solución de trabajo de 5 ppm, 1 ppm, 500 ppb 300 ppb, 150 ppb, 75 ppb y 20 ppb en PBS. Para ello se tomó el volumen necesario de aflatoxina en metanol, se adicionó al PBS y se evaporó en cabina el metanol hasta su eliminación total. Las concentraciones finales fueron corroboradas

mediante lectura en HPLC, lo cual se presenta en la Tabla 3.4 y la Figura 3.3. Las soluciones de trabajo se alicuotaron y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Tabla 3.4 Concentraciones teóricas de aflatoxina B₁ y área obtenida en la corrida de HPLC

CONCENTRACION TEÓRICA (ppb)	AREA CORRIDA
5000.0000	457113.0000
1000.0000	75035.0000
500.0000	37647.0000
100.0000	6383.0000
50.0000	2707.0000
25.0000	1880.0000
10.0000	736.0000
1.0000	0.0000

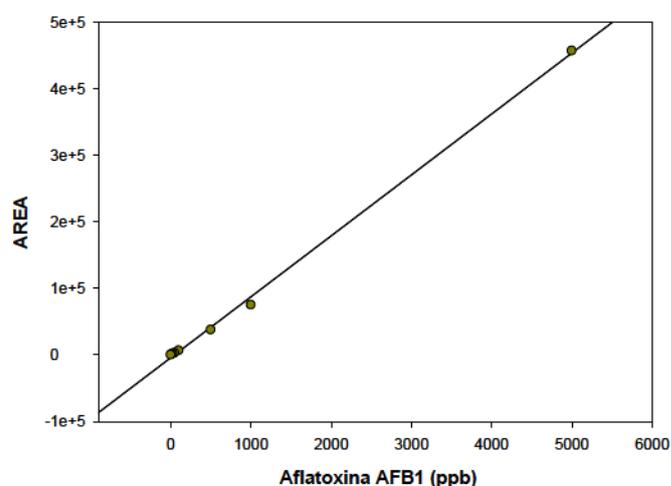


Figura 3.3. Regresión lineal de las áreas y concentraciones de aflatoxina B₁

3.23.2 Preparación de los microorganismos para los experimentos de captura de aflatoxina B₁.

a) Conjunto de microorganismos totales del gránulo de kefir.

Se utilizaron gránulos de kefir CIDCA AGK1 congelados a -20°C , los cuales se reactivaron mediante dos pasajes consecutivos en leche. Estos gránulos se adaptaron al PS mediante pasajes sucesivos en PS, se trabajó con gránulos en permanencia en PS como máximo de 4 semanas. El permeado de suero fermentado con el gránulo CIDCA AGK1 (PSFG) se separó de los gránulos mediante colador de malla de 1 mm^2 y se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos en centrífuga Rolco[®]. Se consideró que el pellet

de microorganismos obtenidos a partir del PSFG contenía los microorganismos representativos del gránulo de kefir CIDCA AGK1.

b) Microorganismos aislados del gránulo de kefir.

Los microorganismos aislados fueron sometidos a dos pasajes de 24 horas a 30°C en caldo MRS a los efectos de ser reactivados. Una vez reactivados, los microorganismos se cultivaron en 30 ml de caldo MRS o de permeado de suero (PS). Los microorganismos se cosecharon a las 24 horas de incubación y se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos en centrífuga Rolco®.

3.23.3 Captura de aflatoxina B₁ por microorganismos aislados del kefir y microorganismos totales del gránulo CIDCA AGK1.

Tanto para los microorganismos aislados como para el conjunto de microorganismos provenientes del gránulo de kefir, se continuó con el siguiente procedimiento. Se hicieron dos lavados con PBS (Solución tampón de fosfato: Na₂HCO₃, KH₂PO₄ y NaCl) a pH 7 y una vez con agua bidestilada estéril. Los *pellets* se resuspendieron en 2 ml de solución de aflatoxina B₁. En paralelo se hizo un control sin aflatoxina resuspendiendo los pellets en PBS y un control de aflatoxina sin microorganismo.

Para cada experimento, las concentraciones de microorganismos se corroboraron por recuento en MRS e YGC respectivamente en pellets resuspendidos en PBS, obteniéndose concentraciones de aproximadamente 1 x 10⁹ UFC/ml de bacterias y 1 x 10⁸ UFC/ml de levaduras para los microorganismos aislados. En el caso del conjunto de microorganismos del gránulo, las concentraciones fueron de 1 x 10⁸ UFC/ml de bacterias y 1 x 10⁷ UFC/ml de levaduras.

Los desafíos se hicieron co-incubando los microorganismos resuspendidos en 2 ml de solución de 150 ppb de aflatoxina B₁ a 30°C durante 30 minutos en un agitador orbital (Peltonen, El-Nezami, Haskard, Ahokas & Salminen, 2001). Una vez terminado el desafío, se centrifugó toda la solución por 15 minutos a 13000 rpm en ultracentrífuga Eppendorf 5415D (Eppendorf®, Alemania), separando el sobrenadante (SN) del pellet (P), los cuales se almacenaron a -20°C.

La capacidad de secuestro de aflatoxina por los microorganismos, se determinó midiendo la cantidad de aflatoxina restante en el SN mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), determinándose el área del pico de aflatoxina B₁ en el sobrenadante. Se utilizó como control solución de aflatoxina B₁ en la concentración usada en el desafío disuelta en PBS. Por último, la capacidad de retención de aflatoxina por parte de los microorganismos, se determinó mediante lavados sucesivos del *pellet* microbiano con PBS. Los pasos seguidos para realizar los experimentos de captura se observan en la Figura 3.4.

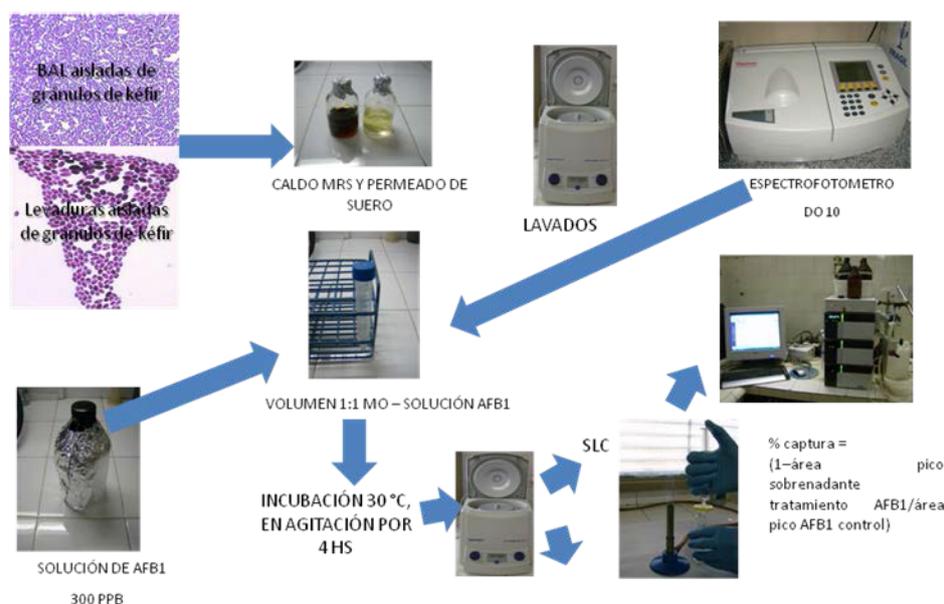


Figura 3.4. Etapas de los experimentos de captura de aflatoxina B₁.

3.23.4 Recuento de los microorganismos empleados en los estudios de captura de aflatoxina B₁.

Previo al ensayo de captura se hizo el recuento de los microorganismos empleados. Se hizo el homogenizado diluyendo 1 ml de la solución de microorganismos en 9 ml de agua de peptona y se hicieron diluciones seriadas 1/10, hasta la dilución 1×10^{-7} para lactobacilos y 1×10^{-6} para levaduras. Se sembraron 100 μ l de las últimas tres diluciones en superficie de agar MRS (Difco[®], Beauvais, Francia) e YGC (Biokar Diagnostics[®], Beauvais, Francia) para las BAL y LEV respectivamente, dispersando el inóculo con perlas de vidrio estériles. Las placas se incubaron a 30°C por 48 horas las BAL y 5 días las levaduras. En los experimentos donde el desafío microorganismo –

aflatoxina se hicieron a diferentes valores de pH, se hizo recuento de los microorganismos antes y después del desafío a fin de determinar si morían por las condiciones del medio y poder relacionarlo con la captura de aflatoxina B₁.

3.23.5 Determinación de la concentración de aflatoxina B₁ en el sobrenadante (SN) del desafío, mediante HPLC.

La concentración de aflatoxina presente en el sobrenadante luego del desafío se evaluó inyectando 20 µl del SN en un HPLC (condiciones descriptas previamente). Se integró el área del pico de la aflatoxina remanente en el SN de cada tratamiento y en el SN del control de aflatoxina AFB₁. El porcentaje de captura de aflatoxina B₁ (%CAFB₁) en cada tratamiento se calculó mediante la siguiente fórmula.

$$\%CAFB_1 = [1 - (\text{Área del pico del tratamiento} / \text{Área del pico del control AFB}_1)] * 100$$

Ecuación 3.11

(Peltonen, El-Nezami, Haskard, Ahokas & Salminen, 2001).

3.24 Estudio del efecto citotóxico de la aflatoxina B₁ en las líneas celulares HepG2 y Caco-2TC7.

El estudio del efecto del kefir sobre el daño celular producido por aflatoxina B₁ sobre células HepG2 (pasaje 10-22) y Caco-2TC7 (pasaje 48-58), se midió a través de las técnicas de determinación de la actividad deshidrogenasa mitocondrial (MTT) y determinación de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) y adicionalmente, en las células HepG2 también se realizó la metodología de tinción de los núcleos necróticos con yoduro de propidio (IP). La línea celular HepG2, descubierta en 1980, proviene de un adolescente caucásico que sufría de cáncer hepático o hepatocarcinoma, y su crecimiento es de tipo epitelial formando pequeños agregados (Sahu, 2007). Por otra parte, las células Caco-2 provienen de un carcinoma de colon humano, se diferencian en enterocitos maduros luego de llegar a confluencia, y son células polarizadas con desarrollo del borde apical "en cepillo" (Pinto y col., 1983; Chantret y col., 1994). La línea celular Caco-2/TC-7, las utilizadas en este trabajo, es un clon aislado de la línea celular Caco-2. Estas células se diferencian a enterocitos en tiempos más cortos y formando una población más homogénea que la línea Caco-2 (Turco y col., 2011).

3.24.1 Descongelación de células almacenadas en nitrógeno líquido.

Se retiró un vial con las células deseadas. Se descongeló el mismo en baño de agua a 37°C. Se centrifugó las células a 2500 rpm por 5 minutos. Bajo flujo laminar, se sacó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de medio D-MEM. Se trasvasó el contenido a una botella de 25 cm² y se le adicionó 4 ml de D-MEM. Se incubó las células en estufa a 37°C con 5% CO₂/95% aire. Se renovó el medio celular y se amplificó las células como se indica en el numeral siguiente.

3.24.2 Inoculación de células adherentes HepG2 y Caco-2TC7.

Bajo el flujo laminar bioseguridad II 1190 x 600 x 600 – NF X 44-201. Marca Jouan[®]. Primero, se descartó el medio agotado D-MEM con suero fetal bovino (SF) (medio D-MEM con SF al 10 y 15% para el cultivo de las células HpeG2 y Caco-2TC7, respectivamente) con una pipeta de 10 ml de vidrio estéril. Se lavó la monocapa tres veces con PBS estéril (10 ml para botellas de 75 cm² y 5 ml para botellas de 25 cm²) con una pipeta distinta cada vez. Se agregó tripsina termostatisada a temperatura ambiente sobre la pared opuesta de la monocapa (2 ml para botellas de 75 cm² y 1 ml para botellas de 25 cm²). Se incubó en estufa (37°C con 5% CO₂/95% O₂) hasta lograr el desprendimiento de la mayor parte de la monocapa. A intervalos de 2 minutos se agitó la botella para facilitar el desprendimiento de las células. Luego, bajo flujo laminar, se colocó el volumen de medio correspondiente y se usó una pipeta para completar el desprendimiento de las células escurriendo el líquido sobre la pared que contenía la monocapa adherida pero sin raspar con la punta de la pipeta. Utilizando la misma pipeta, se homogeneizó la suspensión para desarmar los grumos y se pasó todo el contenido a un tubo de polipropileno cónico estéril. A continuación, se recuperó las células centrifugando durante 5 minutos a no más de 1500 g. luego, se volviendo al flujo laminar, se descartó el sobrenadante con una pipeta estéril. Usando una nueva pipeta, se agregó medio de cultivo nuevo, se utilizó la misma pipeta para mezclar las células con el medio de cultivo, aspirando y expulsando el líquido repetidas veces. Después, se separó en un ependorf 100-150 µl de la suspensión para titular. Se tomó 50 µl de la suspensión celular y se mezcló con 50 µl de azul tripan al 2%. Se realizó el conteo en cámara de Neubauer en un microscopio invertido. En base al recuento, se preparó una suspensión de células y se distribuyó el volumen correspondiente (para

botellas de reserva se preparó una suspensión de una concentración de 5×10^4 células/ml y para placas de 48 pocillos se realizó una suspensión de $2,5 \times 10^5$ células/ml). Al terminar de inocular las placas o botellas, se sacudieron ligeramente para distribuir homogéneamente las células en toda la superficie en toda de superficie. Por último, se verificó microscópicamente el material preparado y se procedió a incubar las células en estufa a 37°C con 5% $\text{CO}_2/95\%$ aire.

El medio celular agotado se renovó cada 2 días. Para ellos, se retiró la botella de la estufa a 37°C con 5% $\text{CO}_2/95\%$ aire y se realizó la observación macro y microscópica de las células antes de renovar el medio de cultivo. A continuación, se extrajo el medio agotado con pipeta estéril. Con una nueva pipeta, se cargó el volumen de medio de cultivo adecuado sobre la pared opuesta a la que contiene la monocapa. Se introdujo las células nuevamente en la estufa a 37°C con 5% $\text{CO}_2/95\%$ aire.

4.24.3 Construcción de la curva de calibración.

Se procedió a obtener placas de 24 o 48 pocillos de los cultivos celulares. Las células en la placa se incubaron entre 1 y 7 días en estufa a 37°C con 5% $\text{CO}_2/95\%$ aire para formar la monocapa en cada pocillo (las células HepG2 se incubaron durante 1 día, mientras que las células Caco-2TC7 requirieron 7 días para formar la monocapa y diferenciarse. Durante los 7 días el medio se renovó cada 2 días). A continuación, se cambió el medio de cultivo agotado por medio D-MEM nuevo solo o con diferentes concentraciones de aflatoxina B_1 . La placa se incubó 24 h en estufa a 37°C con 5% $\text{CO}_2/95\%$ aire. Las concentraciones probadas fueron las siguientes: 0 ppb, 0,1 ppb, 1 ppb, 10 ppb, 100 ppb, 200 ppb, 300 ppb, 400 ppb y 500 ppb. Pasado ese tiempo, se reveló el daño celular por el método pertinente.

3.24.4 Evaluación del efecto citotóxico de la aflatoxina B_1 sobre las células HepG2 y Caco-2TC7 mediante ensayo MTT.

Se realizó un ensayo de proliferación celular mediante ensayo con sal de tetrazolio bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazolio (MTT) sobre células HepG2 y Caco-2TC7.

El ensayo de MTT es un método colorimétrico que puede detectar el daño de las células producido por la acción de xenobióticos (como las aflatoxinas), que provoca un daño celular interrumpiendo las actividades metabólicas normales de las células.

Se basa en medir la reducción de la sal de MTT por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa que da lugar a un compuesto insoluble que precipita formando cristales de formazán. La densidad óptica de la solución coloreada extraída del precipitado es medida con un espectrofotómetro dando una absorbancia que es función de la concentración de la sal transformada, la cual se correlaciona con el número de células activas metabólicamente. En este ensayo la actividad de succinato-deshidrogenasa es un índice de la proliferación celular (Hansen y Brünner, 1998).

Las células fueron crecidas en placa de 24 pocillos (Greiner Bio One, Frieckenhausen, Alemania) en medio D-MEM. Estas fueron cultivadas durante 1 o 7 días, según la línea celular, a 37° en estufa de cultivo celular con atmósfera controlada de CO₂ (5%) hasta alcanzar 70% de confluencia.

Se extrajo el medio D-MEM agotado, y se colocó medio D-MEM nuevo con o sin distintas concentraciones de aflatoxina B₁. Se incubó a 37°C y 5% CO₂ durante 24 horas.

Para el revelado se descartó el contenido de la placa y se agregaron 500 µl de la sal de MTT (0,5 mg/ml) diluída 1/10. Se incubó durante 3 horas y media en estufa de cultivo al abrigo de la luz (con papel metálico). Luego de transcurrido el tiempo para la formación del precipitado de la sal, se descartó el MTT excedente y se añadió 500 µl de HCl (0,1 M en isopropanol) para disolver los cristales de formazán.

Las suspensiones se leyeron en lector de placas (ELISA Plate Reader STL Rainwob Reader, Wien, Austria) a 550 nm, previa agitación a velocidad media durante 5 minutos.

3.24.5 Tinción con Ioduro de Propidio

Las células fueron crecidas en placa de 24 pocillos con vidrios adtos para el cultivo celular en cada fosa (Greiner Bio One, Frieckenhausen, Alemania) en medio D-MEM. Estas fueron cultivadas durante 1 día, a 37° en estufa de cultivo celular con atmósfera controlada de CO₂ (5%) hasta alcanzar 70% de confluencia.

Transcurrido dicho tiempo, se descartó el medio agotado y se adicionó 0,5 ml del medio D-MEM con distintas concentraciones de aflatoxina B₁ (0, 100, 150, 200, 300, 400 y

500 ppb) sobre la monocapa de células HepG2. Las células se incubaron durante 1 día. A continuación, se descartó el medio de cultivo y las células fueron lavadas 2 veces con buffer PBS adicionado con 0,2% de gelatina. Luego se colocó 100 µl de solución de yoduro de propidio (10µg/ml de buffer PBS adicionado con 0,2% de gelatina).

Se incubó 15 minutos en hielo. Se retiró el líquido y se montaron en glicerol 50% (vol/vol). Se examinaron las células por microscopía de fluorescencia (Leica DMLB - Leica Microscopy Systems Ltd. CH Heerbrugg, Switzerland). Se contabilizaron el número de células teñidas de color rojo por fosa.

3.24.6 Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa

Se midió la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en células Caco-2TC7 diferenciadas y células HepG2. Esta enzima intracelular es una oxidoreductasa y participa en el metabolismo energético anaerobio, reduciendo el piruvato a L-lactato para regenerar el NAD⁺.



La determinación de la concentración de esta enzima liberada al medio refleja el daño celular. Se utilizó un kit comercial de determinación de LDH (Wiener Lab, Rosario, Argentina).

Las células fueron crecidas en placa de 24 pocillos (Greiner Bio One, Frieckenhausen, Alemania) en medio D-MEM. Estas fueron cultivadas durante 1 o 7 días, según la línea celular, a 37° en estufa de cultivo celular con atmósfera controlada de CO₂ (5%) hasta alcanzar 70% de confluencia.

Se extrajo el medio D-MEM agotado, y se colocó medio D-MEM nuevo con o sin distintas concentraciones de aflatoxina B₁ y de microorganismos totales del kefir. Se incubó a 37°C y 5% CO₂ durante 24 horas.

Pasado ese tiempo, se extrajo una alícuota de cada muestra libre de células y se agregó el sustrato del kit que contiene NADH₂, fosfatos y piruvatos. Se midió cada un minuto, los cambios de la densidad óptica que reflejaron la reducción del NADH₂ debido a la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa presente en el medio (LDH). La actividad enzimática se estableció en unidades internacionales (U/I). La medición se realizó con

un espectrofotómetro por lectura de la DO a 340 nm (Beckman DU 650, Palo Alto, USA).

4.24.7 Ensayos de adhesión en células Caco-2TC7.

Se obtuvo monocapas de células Caco-2TC7 en placas de 24 pocillos. Luego de 7 días, donde las células se diferenciaron. Se lavaron las monocapas 3 veces con PBS. Simultáneamente, se obtuvieron los microorganismos totales del kefir como se describe previamente.

A continuación, se colocaron en las fosas de la placa 0,25 ml de una suspensión microbiana (en PBS y con una $DO_{600NM}=10$) y 0,25 ml de DMEM sin suplementar. La placa se incubó en atmósfera de CO_2 a $37^\circ C$ durante una hora. Concluido ese tiempo, las fosas se lavaron 3 veces con PBS para eliminar los microorganismos no asociados. Se adicionó a cada fosa 1 ml de agua miliQ y se incubaron las células 1 hora a $37^\circ C$. Se homogeneizó el contenido de cada fosa con pipeta automática y se pasó a ependorff's estériles. Luego, se realizaron diluciones seriadas con agua con triptona 0,1% y se sembraron en agar MRS e YGC para recuentos de bacterias y levaduras viables, respectivamente. Y con el fin de determinar la presencia de microorganismos totales, se realizó la técnica de Breed, (Meynell and Meynell, 1970): se colocaron 10 μl de la dilución correspondiente en 1 cm^2 delimitado en un portaobjetos. Se efectuó tinción con cristal violeta (5 minutos) y se contaron las bacterias en todos los campos a lo largo del recorrido de un extremo a otro del cuadrado mediante microscopía óptica. El número de bacterias asociadas se calculó como UFC/ml de suspensión.

4.24.8 Efecto protector de los microorganismos del kefir sobre las células en presencia de aflatoxina B₁.

- Co-incubación previa de los microorganismos del kefir con aflatoxina B₁.

Las células HepG2 y Caco-2TC7 se desafiaron con AFB1 (10, 50, 150 y 300 ppb en HepG2 y 300 y 500 ppb en Caco-2TC7) y microorganismos totales del kefir. Los microorganismos totales del kefir se obtuvieron siguiendo la metodología indicada previamente, luego se incubaron previamente 30 minutos con la AFB1 en medio D-MEM, y luego eso se adicionó sobre las células, después de lavar las células con PBS.

- Adición simultánea de los microorganismos del kefir y aflatoxina B₁ sobre la monocapa celular Caco-2TC7.

También se realizó un ensayo con las mismas concentraciones de aflatoxina B₁ estudiadas antes donde el desafío entre la micotoxina y los microorganismos del kefir tuvo lugar mezclando directamente sobre los pocillos donde se encontraban las células.

- Efecto protector de los microorganismos totales del kefir adheridos sobre una monocapa celular Caco-2TC7.

En una monocapa diferenciada de una semana, se quitó el medio DMEM agotado y se puso en contacto con una suspensión de PBS con los microorganismos totales del kefir por 1 h para permitir la asociación de los microorganismos con las células. Luego, se realizaron 3 lavados con PBS para eliminar los microorganismos no adheridos, y finalmente, se adicionó la aflatoxina B₁ contenida en el medio DMEM. Las células se incubaron 24 h en estufa a 37°C con 5% CO₂/95% aire. Por último, se realizó el ensayo de la lactato deshidrogenasa (LDH) mediante el kit LDH P-UV Unitest de [Wiener lab[®]](#), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.25 Análisis estadístico

Con el fin de establecer si existía diferencia estadísticamente significativa entre las velocidades de crecimiento, las fases de latencia, las concentraciones de aflatoxina obtenidas y actividad enzimática en las líneas celulares, se hicieron análisis de varianza y pruebas de medias usando el programa STATGRAPHICS CENTURIÓN 5.1[®].

RESULTADOS
Y
DISCUSIÓN

4.1 Estudio de la capacidad de crecimiento de los microorganismos del kefir en permeado de suero (PS).

La Argentina destina el 33-34% de la producción nacional de leche a la elaboración de quesos. Alrededor del 70% de las empresas lácteas producen exclusivamente este producto o bien disponen de líneas para su producción. El principal subproducto de su actividad es el suero. Se estima que en nuestro país se producen anualmente 450 mil toneladas de suero líquido (Speranza, 2011; INTA, 2014), de los cuales, aproximadamente el 33% se destina a la obtención de lactosa y derivados proteicos y el 4-5% es transformado en suero en polvo. El 60% restante se desecha como efluente o es aprovechado, con bajo nivel tecnológico, en la alimentación de cerdos y bovinos.

La mayoría de las pequeñas empresas no tienen resuelto aún el destino del lactosuero y esto provoca impactos ambientales negativos. Esta situación pone a muchas de estas empresas y a su entorno socioeconómico (normalmente radicadas en pequeñas poblaciones del interior del país) en situación de riesgo (clausura, limitaciones para acceder a ciertos mercados, contaminación de fuentes de agua y conflictos socio – ambientales locales) (INTA, 2014).

La recuperación y posterior procesamiento del lactosuero no sólo beneficiaría a las empresas desde el punto de vista económico comercial, a través de la obtención de productos de alto valor agregado, sino que además estaría resolviendo un problema ambiental asociado al vertido del suero.

Estudios previos han demostrado que los gránulos de kefir tienen la capacidad de fermentar, tanto la leche (sustrato original de los gránulos) como el suero de quesería (Londero, 2012; Londero y col., 2014).

Adicionalmente, el suero puede ser filtrado para extraer las proteínas, obteniéndose un subproducto adicional que es el permeado de suero (PS). Este permeado de suero contiene principalmente lactosa y una baja concentración de nitrógeno, de modo que podría ser fermentado por los gránulos de kefir. Se propuso como objetivo estudiar las condiciones para producir PS fermentado con los microorganismos del kefir.

4.1.1 Estudio de la cinética de fermentación del PS con microorganismos aislados del kefir y con gránulo de kefir CIDCA AGK1.

Como base para los ensayos de cinéticas de acidificación y aumento de biomasa de los gránulos de kefir cultivados en PS, se realizó la determinación de la concentración de nitrógeno, lactosa y cenizas para sustentar la hipótesis de que de los gránulos tienen la capacidad de crecer en PS, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.1.1.

Tabla 4.1.1. Contenido de nitrógeno, lactosa, cenizas y pH del PS resuspendido al 5%.

	pH	Nitrógeno Total (%)	Lactosa (%)	Cenizas (%)
PS 1	6,50	0,0200	3,33	0,28
PS 2	6,40	0,0018	3,54	0,26

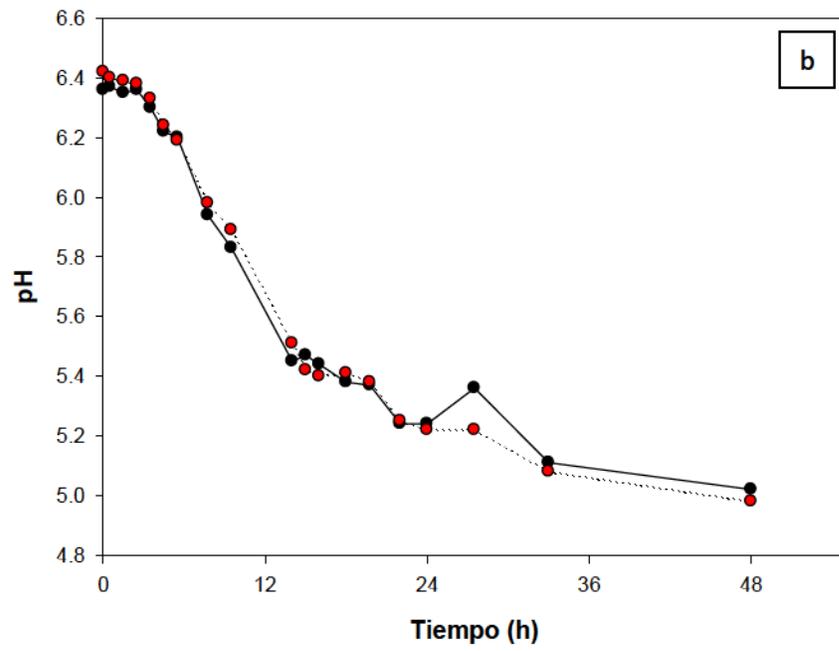
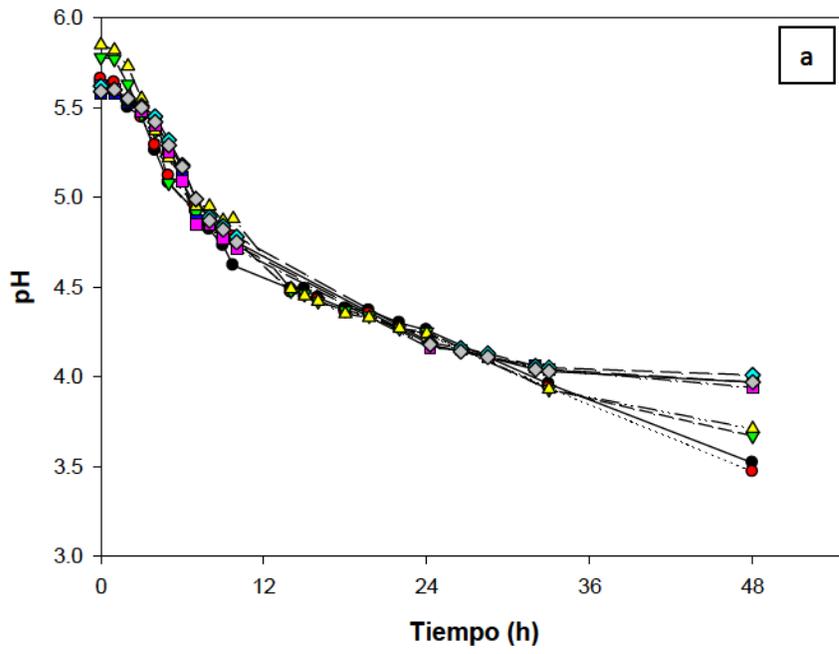
PS 1: adquirido de la empresa Ilolay[®], Santa Fe, Argentina. PS 2: Arla Foods[®], CABA, Argentina. Las determinaciones se realizaron según se indicó en materiales y métodos.

Se observó que la concentración de lactosa y cenizas fue muy similar para los PS que se disponía, lo mismo que el pH del permeado resuspendido (5%). Sin embargo, la concentración de nitrógeno fue aproximadamente 10 veces mayor en el PS 1 que en el PS 2.

Se realizaron los estudios de fermentación del permeado de suero con gránulos de kefir CIDCA AGK1, 4 cepas de *Lactobacillus plantarum* y una cepa de *Kluyveromyces marxianus*, todas aisladas de gránulos de kefir, según se indica en materiales y métodos.

El PS se incubó a 30°C y se realizaron cinéticas de acidificación y crecimiento microbiano según se indicó en la metodología. Los resultados se observan en la Figura 4.1.1 y Tabla 4.1.2.

En el caso de las cinéticas se leyó el pH periódicamente y como se observa en la Figura 4.1.2, *L. plantarum* CIDCA 83114, *L. plantarum* CIDCA 8316, *L. plantarum* CIDCA 8318, *L. plantarum* CIDCA 8316, *L. plantarum* CIDCA 8329, *K. marxianus* CIDCA 8154 y gránulos de kefir CIDCA AGK1, tuvieron la capacidad de fermentar el PS.



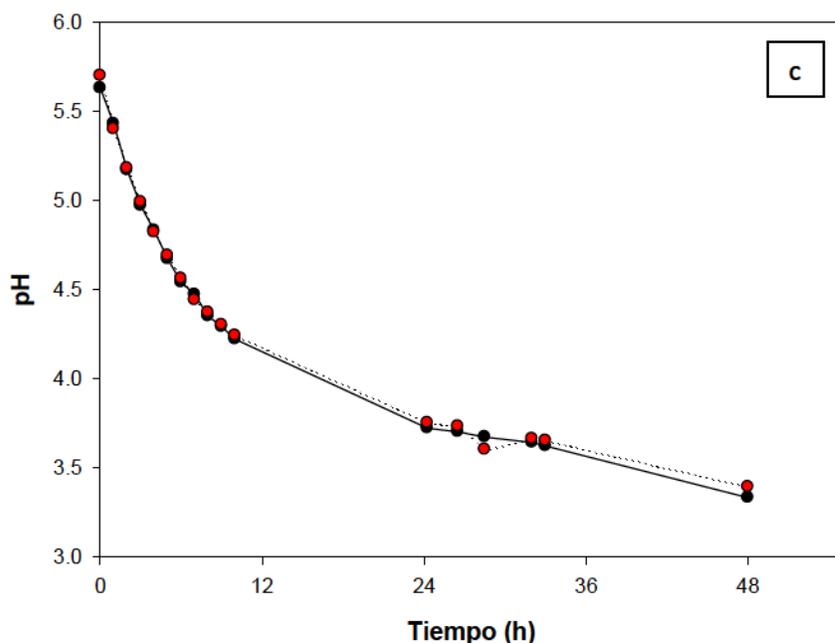


Figura 4.1.1. Cinéticas de acidificación del PS incubado con lactobacilos aislados del kefir (a), levaduras aisladas del kefir (b) y gránulos de kefir CIDCA AGK1 (c): a) lactobacilos: ● *L. plantarum* CIDCA 83114A; ● *L. plantarum* CIDCA 83114B; ▼ *L. plantarum* CIDCA 8316A; ▲ *L. plantarum* CIDCA 8316B; ■ *L. plantarum* CIDCA 8318A; ■ *L. plantarum* CIDCA 8318B; ◆ *L. plantarum* CIDCA 8329A; ◆ *L. plantarum* CIDCA 8329B. b) levadura: ● *K. marxianus* CIDCA 8154A; ● *K. marxianus* CIDCA 8154B; c) ● gránulo de kefir CIDCA AGK1A; ● gránulo de kefir CIDCA AGK1B. Donde A y B son dos cinéticas de acidificación realizadas en forma independiente.

Todos los microorganismos probados presentaron la misma tendencia, un rápido descenso del pH en las primeras horas, y un descenso más lento posterior hasta llegar a un pH final que varía según el tipo de microorganismo utilizado en la fermentación. En el caso de los lactobacilos, el descenso de pH fue rápido durante 9 horas, alcanzando un pH de 4,70. En el caso de *K. marxianus* (levadura fermentadora de lactosa) la acidificación rápida produce un producto de pH de 5,40 después de 13 horas de fermentación. Con los gránulos se observó una acidificación rápida durante 10 hs de fermentación hasta un pH de 4,20. En todos los casos, a partir de las 9 – 13 horas, la velocidad de acidificación fue menor. Todas las cepas de *Lactobacillus plantarum* estudiadas presentaron la misma cinética de acidificación alcanzando aproximadamente un pH de 4,0 a las 30 h, este pH puede ser aún menor si se le

aumenta el tiempo de incubación, para algunas cepas. Los pH finales después de 48 h de incubación estuvieron entre 3,5 y 4,0, siendo *L. plantarum* CIDCA 83114 la más acidificante.

En el caso de la levadura, la acidificación fue menor, lográndose un pH de 5,3 a las 30 h y a diferencia de los lactobacilos y los gránulos de kefir, el pH final fue 5,0, luego de 48 h de incubación. También se observó que esta levadura redujo la concentración de lactosa del PS desde alrededor del 3,40% (Tabla 4.1.1) entre 1 – 1,2% luego del tiempo de incubación mencionado previamente. Por otra parte, los gránulos de kefir mostraron la mayor pendiente en las primeras horas de incubación (pH de 4,20 a las 10 h), llegando a un pH final de 3,35, luego de 48 h de incubación a 30°C. Sin embargo, en el PS fermentado con gránulos de kefir, la reducción de la lactosa fue menor que la producida por la levadura, encontrándose entre 2,1 – 2,3% de lactosa luego de la fermentación. No obstante, el hecho de que el producto fermentado con los gránulos posea la capacidad de alcanzar el pH tan bajo en el menor tiempo posible es una ventaja útil para la aplicación del gránulo de kefir como un potencial bioconservante.

Se realizaron recuentos en agar MRS (para bacterias lácticas) y/o agar YGC (para levaduras) al finalizar el tiempo de incubación establecido. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.1.2. Se observó que los recuentos de los lactobacilos estuvieron entre 10^8 y 10^9 UFC/ml. El recuento de levaduras estuvo alrededor de 10^7 UFC/ml. Por último, en los gránulos de kefir se observó un recuento de 10^8 y 10^7 UFC/ml de BAL y levaduras, respectivamente. Estos recuentos estuvieron un orden logarítmico por debajo a los observados para los mismos microorganismos desarrollados en caldo MRS, para el caso de los lactobacilos. Mientras que la levadura presentó un recuento con el mismo orden logarítmico (10^7 UFC/ml) tanto el caldo MRS como en PS. Por otro lado, los recuentos del PS fermentado con los gránulos de kefir no presentaron grandes cambios con respecto a los obtenidos cuando la fermentación se realizó en leche. Los recuentos obtenidos en leche fermentada con gránulos fueron entre $10^8 - 10^9$ y $10^7 - 10^8$ UFC/ml para BAL y levaduras, respectivamente.

Tabla 4.1.2. Recuentos de lactobacilos, levadura y gránulos de kefir CIDCA AGK1 desarrollados en PS, leche o MRS.

Microorganismos	Recuento (UFC/ml) desarrollados en PS	Recuento (UFC/ml) desarrollados en leche o MRS
<i>L. plantarum</i> 83114	$2,85 \pm 0,66 \times 10^9$	$4,22 \pm 0,20 \times 10^9$ (MRS)
<i>L. plantarum</i> 8316	$2,42 \pm 0,41 \times 10^9$	$1,35 \pm 0,11 \times 10^{10}$ (MRS)
<i>L. plantarum</i> 8318	$1,93 \pm 0,35 \times 10^9$	$1,76 \pm 0,49 \times 10^{10}$ (MRS)
<i>L. plantarum</i> 8329	$1,42 \pm 0,74 \times 10^8$	$1,95 \pm 0,48 \times 10^{10}$ (MRS)
<i>K. marxianus</i> 8154	$5,02 \pm 0,21 \times 10^7$	$1,32 \pm 0,64 \times 10^7$ (MRS)
Gránulo de kefir CIDCA AGK1	$1,77 \pm 0,25 \times 10^8$ BAL; $3,01 \pm 0,32 \times 10^7$ levaduras.	$4,24 \pm 0,46 \times 10^8$ BAL; $5,33 \pm 0,29 \times 10^7$ levaduras (leche).

Además se quiso establecer si la cinética de acidificación del gránulo era afectada por el tiempo de permanencia del gránulo en el PS. Para ello, se efectuó la cinética de acidificación de gránulos con 4 y 12 semanas de repiques sucesivos en PS. Los resultados se ven en el Figura 4.1.2.

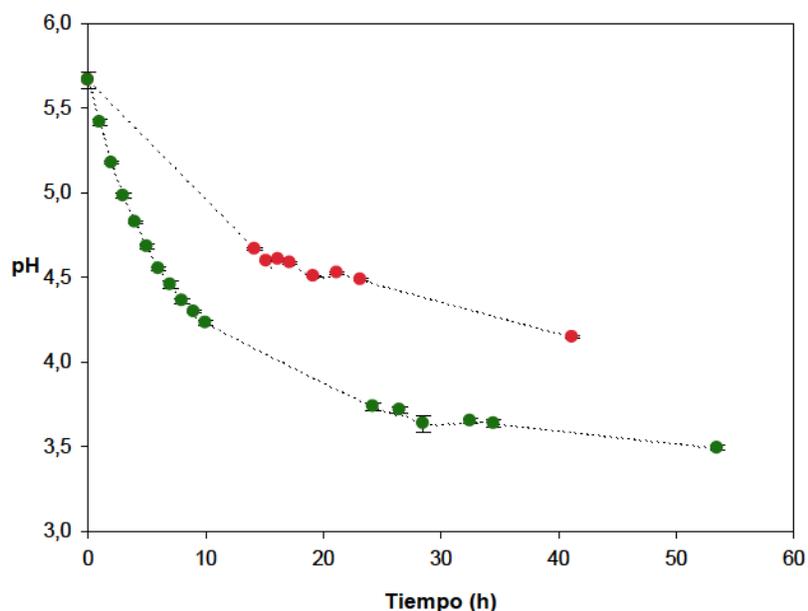


Figura 4.1.2. Cinética de acidificación de gránulo de kefir CIDCA AGK1 con distintos tiempos de adaptación en PS: ● Kefir 1, con 4 semanas en PS; ● Kefir 2, con 12 semanas en PS. Resultados promedio de tres repeticiones.

En la Figura 4.1.2 se puede apreciar que hay una diferencia de comportamiento entre los gránulos con distinta permanencia en el PS, siendo mucho más bajo el pH alcanzado por el kefir 1 (3,49) que el obtenido por el kefir 2 (4,15), este último con 12 semanas de adaptación al PS. Los gránulos desarrollados en leche y utilizados para la fermentación del PS sin adaptación previa al mismo, se comportaron igual que los adaptados durante 4 semanas. Además, estas son similares a la de los gránulos cultivados en leche. En la Figura 4.1.3 se observa la cinética de acidificación de los gránulos cultivados en leche y de los gránulos cultivados en PS sin adaptación previa. Se observa que los gránulos cultivados en leche acidifican dicho medio más rápidamente durante las primeras horas de fermentación, pero luego de 30 horas de incubación, ambas cinéticas coinciden llegando a un pH final muy similar a las 48 horas.

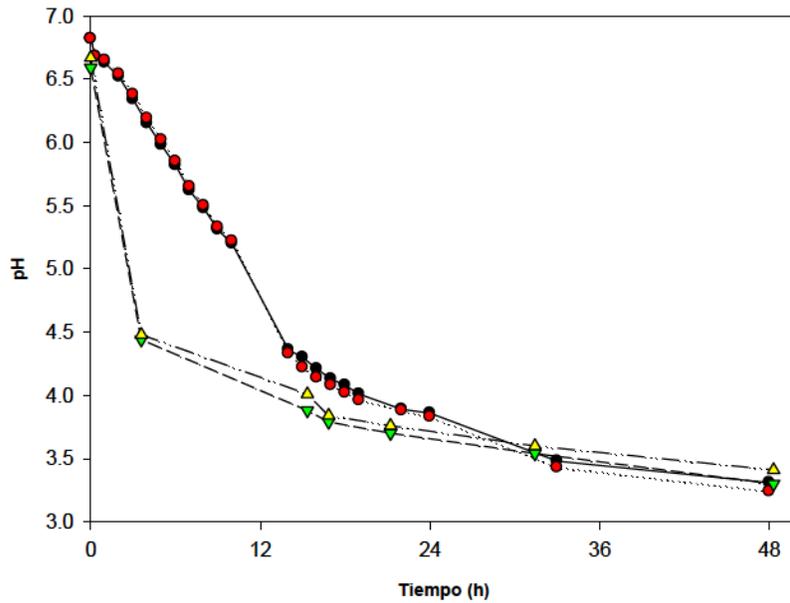


Figura 4.1.3. Cinética de acidificación de gránulo de kefir CIDCA AGK1 cultivados en PS sin adaptación previa al PS (● cinética A; ● cinética B) y de gránulos cultivados en leche (▼ cinética A; ▲ cinética B).

4.1.2 Determinación del cambio de biomasa del gránulo CIDCA AGK1 en PS

Se realizaron ensayos de biomasa independientes, donde se efectuaron repiques sucesivos en leche o en PS al 10% y en cada paso se filtraban los gránulos, se dejaban secar sobre papel absorbente hasta peso constante, para luego ser pesados. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4.1.4.

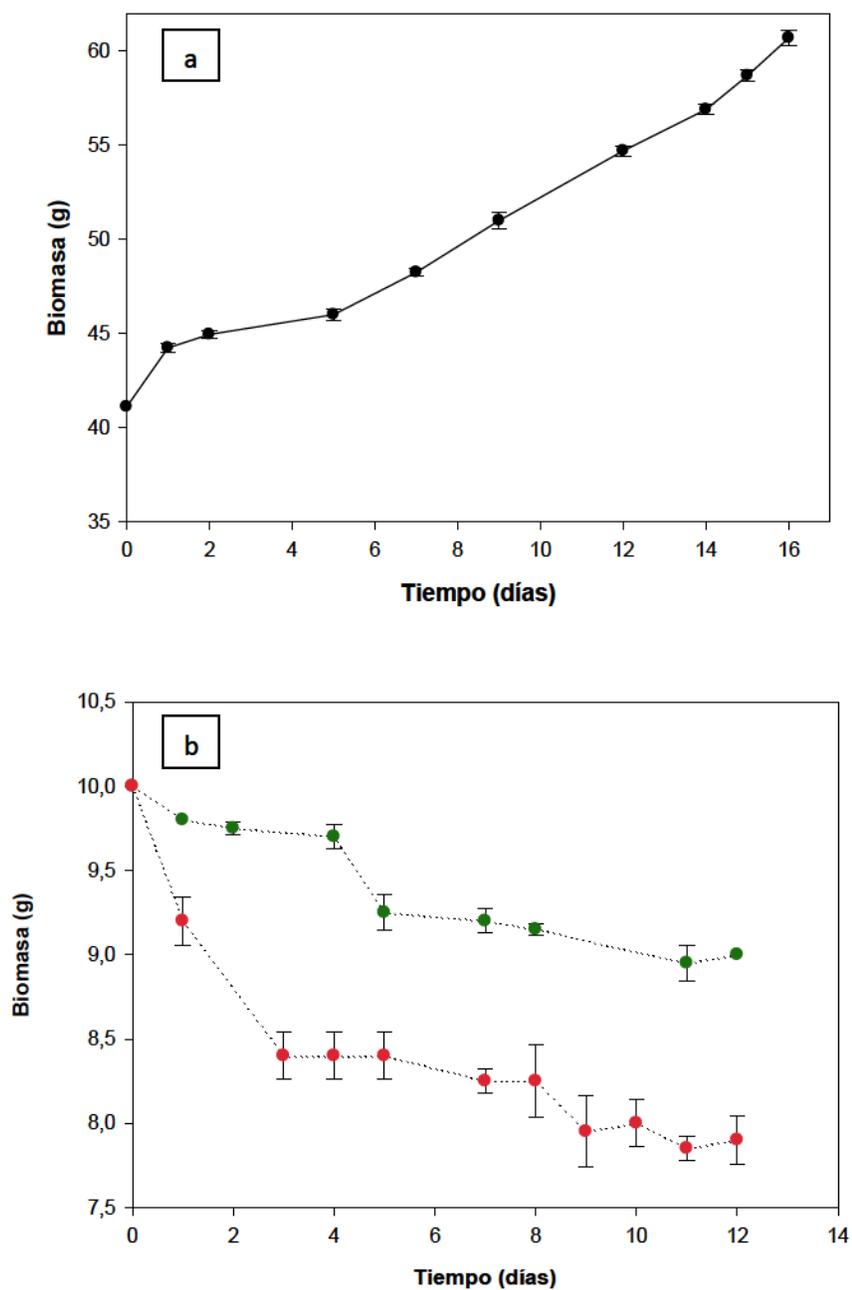


Figura 4.1.4. Cambio de biomasa del gránulo de kefir CIDCA AGK1 cultivados en leche (a) y con distintos tiempos de adaptación en PS (b): a) ● kefir en leche; b) ● Kefir 1, con 4 semanas en PS; ● Kefir 2, con 12 semanas en PS. *Resultados promedio de tres repeticiones.

En la Figura 4.1.4 se observa una clara diferencia en el cambio de biomasa dependiendo del medio en que los gránulos son cultivados. Mientras que en leche se aprecia un aumento de la biomasa de 13,6 g en el repique del día 12, cuando los gránulos son cultivados en PS, estos disminuyeron su biomasa en diferente proporción, según el tiempo de permanencia en el PS. En el caso del kefir 1 (con 4 semanas en PS), éste disminuyó en 1 g la biomasa, mientras que el kefir 2 (con 4 semanas en PS) disminuyó en 2 g, durante los 12 días del ensayo. En ambos casos, se puede observar una tendencia general: un brusco descenso en los primeros dos días y luego una disminución más lenta de biomasa. Previamente se ha estudiado el cambio de biomasa en suero de lechería, encontrando que el gránulo es capaz de incrementar su biomasa cuando utiliza como sustrato suero de leche, pero la formación del mismo se ve afectada por las condiciones de fermentación (Londero, 2012). Cuando la fermentación se llevó a cabo a 30 °C el crecimiento fue similar al obtenido a 20°C durante las primeras fermentaciones, sin embargo luego de 9 cultivos en suero a 30 °C los gránulos presentaron un crecimiento escaso e inconstante (el crecimiento promedio en 20 mediciones resultó de $0,069 \pm 0,07$ g/g).

Se observan cambios significativos tanto en la producción de biomasa como en la velocidad de acidificación entre gránulos adaptados al PS durante 4 semanas y aquellos adaptados durante 12 semanas.

Este cambio de comportamiento tanto en la biomasa como en las cinéticas de acidificación se vio acompañado de cambios macroscópicos en los gránulos de kefir. Los mismos dejaron de ser compactos, se redujeron en tamaño y la mayoría de ellos se depositaban en el fondo del recipiente. Se planteó, que lo anterior, podría deberse a que ante la baja concentración de nitrógeno, habría una disminución de las bacterias lácticas responsables de la acidificación y de la producción de biomasa. Por lo que se decidió hacer un recuento general de BAL y levaduras tanto de los gránulos como del PS fermentado con ellos, tomando como valores de referencia los que se exigen en el Código Alimentario Argentino para leche fermentada por gránulos de kefir y los reportados por investigadores del grupo en leche y PS fermentados con gránulos de kefir CIDCA AGK1. Éstos se indican en la Tabla 4.1.3.

Tabla 4.1.3. Valores de referencia para los recuentos de BAL y levaduras.

Producto	BAL	Levaduras
Leche fermentada*	10^7 - 10^8 UFC/ml	10^6 - 10^7 UFC/ml
Gránulos desarrollados en leche*	10^9 UFC/g	10^7 UFC/g
PS fermentado con gránulos adaptados a PS durante 4 semanas	$3,34 \pm 0,28 \times 10^8$ UFC/ml	$2,66 \pm 0,18 \times 10^7$ UFC/ml
PS fermentado con gránulos adaptados a PS durante 12 semanas	$2,17 \pm 0,35 \times 10^7$ UFC/ml	$1,88 \pm 0,16 \times 10^6$ UFC/ml
Gránulos adaptados a PS durante 12 semanas	$3,1 \pm 0,20 \times 10^9$ UFC/g	$2,37 \pm 0,23 \times 10^8$ UFC/g

* Reportado por León (2013). El Código Alimentario Argentino señala que una leche fermentada con gránulos de kefir debe contener un mínimo de 10^7 y 10^4 UFC/ml BAL y levaduras, respectivamente.

Comparando los datos de la Tabla 4.1.3, se observa que el PS fermentado con gránulos adaptados durante 4 semanas tiene una composición microbiológica equivalente a la de la leche fermentada. Sin embargo, cuando se utilizan gránulos adaptados durante 12 semanas, el producto fermentado tiene una concentración de microorganismos 10 veces menor. Los gránulos adaptados durante 12 semanas contienen una concentración similar a los provenientes de leche en lo referente a BAL, pero presentan una concentración muy superior de levaduras.

Al comparar los valores obtenidos con los de referencia, se puede ver que el recuento general de BAL y levaduras están por encima del mínimo establecido en el Código Alimentario Argentino (CAA, 2010). Por lo que se pensó que las diferencias en la cinéticas de acidificación y de biomasa entre gránulos, con distintos tiempos de permanencia en PS, podría deberse a una disminución de alguna o algunas especies en particular, y a desbalances de la composición relativa de microorganismos que podría generar además las diferencias macroscópicas observadas (Figura 4.1.5).

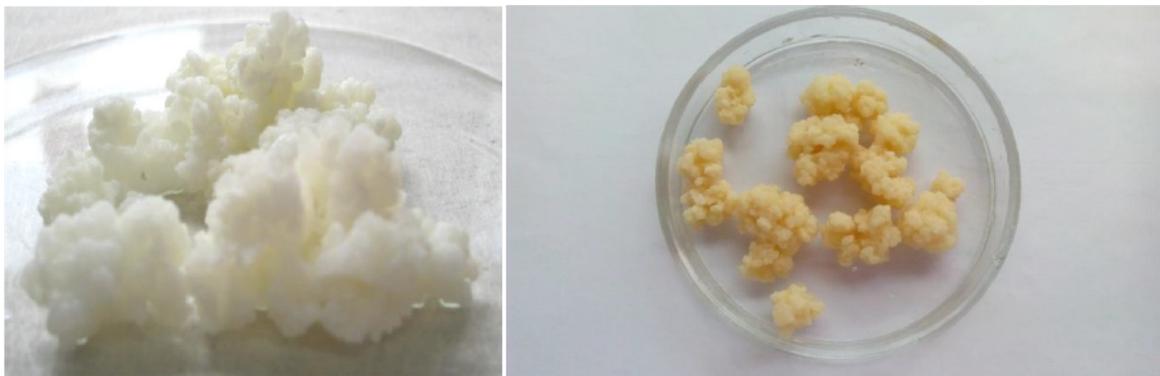


Figura 4.1.5. Gránulos de kefir CIDCA AGK1 **A)** en leche **B)** en PS.

En la Figura 4.1.5 se observa un cambio en el color de gránulos cultivados en leche o PS. Pasando del color blanco característico cuando está en leche a un color marrón claro cuando los gránulos son crecidos en PS.

Recientemente Magalhães et al. (2010) evaluaron la estabilidad de la comunidad microbiana de los gránulos de kefir al cambiar de leche a suero como sustrato, determinando que no había variaciones en la estructura interna del gránulo ni en los perfiles de DGGE de bacterias y levaduras. Otras publicaciones 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 et al., 2010), se acelera la velocidad de fermentación, hay mayor consumo de lactosa (Golfiopoulos et al., 2011) y varían la producción de polisacáridos y las características reológicas del kefir (Rimada et al., 2001; Bensmira et al., 2010).

Londero (2012) también investigó las características del gránulo cultivado a 20, 30 y 37°C en suero de lechería por DGGE y determinó que no se observaron diferencias en los perfiles de bacterias. Sin embargo, la banda cuya secuencia alineó con las levaduras *Kazachstania unispora*, *Kaz. servazzii* y *Kaz. aquatica* y la banda que alineó con *K. marxianus* en el gránulo a 20°C; estuvieron ausentes en los gránulos crecidos a 30 °C y 37 °C. Esto indicó que hubo una reducción de la diversidad de levaduras al aumentar la temperatura de incubación.

En el análisis de los cambios en la cinética de acidificación y biomasa del gránulo, hay que considerar que el PS, como se dijo anteriormente, es un sustrato pobre en nitrógeno, por lo tanto podría pensarse que actúa como un medio selectivo para determinados microorganismos más exigentes en nutrientes que otros que están presentes en la comunidad del kefir. A consecuencia de ello, hay que poner especial atención en el número de repiques en PS que se realizan a los gránulos en dicho medio.

Para evitar la disminución de biomasa y de la velocidad de acidificación en la obtención de PS fermentado se debería mantener un stock de gránulos en leche y, a partir de ellos fermentar el PS utilizando un máximo de repiques de 4 semanas.

4.1.3 Determinación de la capacidad antifúngica de los productos fermentados con gránulo CIDCA AGK1 en PS

Una vez establecidas las condiciones de fermentación y ciertas características de los gránulos cuando son cultivados en PS, se decidió hacer un ensayo de reducción de la germinación para estudiar la capacidad antifúngica de los sobrenadantes obtenidos con los gránulos de kefir.

El permeado de suero fermentado con gránulos hasta distintos pH finales fue centrifugado y filtrado como se describió en materiales y métodos con el objetivo de obtener los sobrenadantes libres de células del permeado de suero fermentado con gránulos de kefir CIDCA AGK1 (SLC PSFG), los cuales se usaron para el ensayo de reducción de la germinación (Figura 4.1.6). Se observó que los SLC PSFG tuvieron un efecto inhibitorio variable sobre los hongos ensayados. Se aprecia que a medida que disminuye el pH de los SLC PSFG se incrementa el porcentaje de inhibición de la germinación. Sin embargo, con SLC PSFG a pH 3,5 o pH 3,3 se obtuvieron porcentajes de inhibición de germinación fuertes (> 70%).

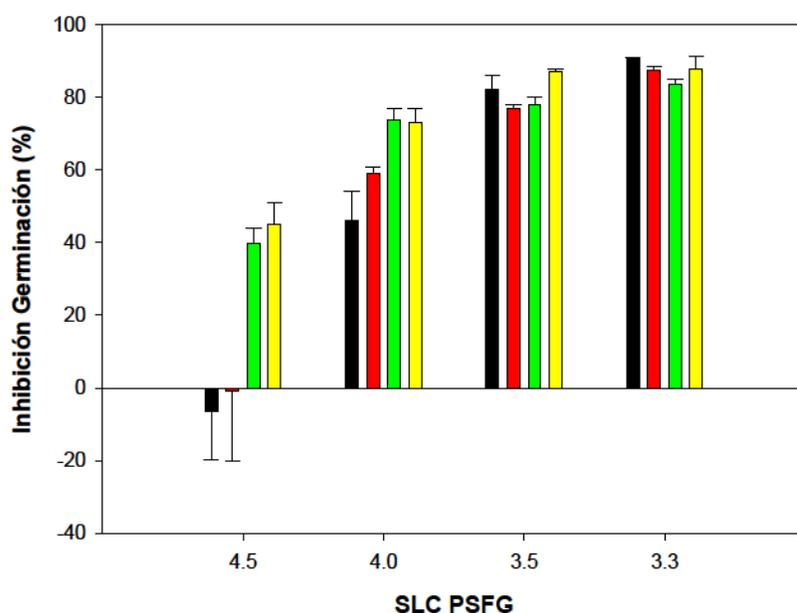


Figura 4.1.6. Porcentajes de inhibición de la germinación de **■** *Aspergillus flavus* AFUNL5; **■** *Penicillium sumatrense* CMUNLP3; **■** *P. crustosum* CMUNLP4; **■** *Fusarium graminearum* Fg48 desafiados a SLC PSFG obtenidos a distintos pH finales de fermentación.

4.1.4 Conclusiones

Los microorganismos del kefir tiene la capacidad de crecer en permeado de suero, presentado cinéticas de acidificación similar a cuando estos son cultivados en leche. Sin embargo, la biomasa de los gránulos se ve reducida a medida que aumenta su permanencia en permeado de suero, las cinéticas de acidificación son más lentas, y la concentración relativa de BAL y levaduras del granulo cambia.

En vista de los resultados obtenidos con los sobrenadantes de kefir en cuanto a su capacidad antifúngica se decidió realizar los experimentos de actividad antifúngica del kefir con PS fermentados con gránulos de kefir adaptados al PS durante cuatro semanas como máximo.

4.2 Estudio de la capacidad inhibitoria de los sobrenadantes de kefir sobre *F. graminearum*.

La mayoría de los productos agrícolas son susceptibles de contaminación por hongos durante algunas de las etapas de producción, procesamiento, transporte o almacenamiento según fue descrito en la introducción general. Tradicionalmente los hongos toxigénicos han sido clasificados como de campo (patógenos de plantas) o de almacenamiento. Como microorganismos patógenos de plantas o de campo encontramos a *Claviceps*, *Fusarium* y *Alternaria*, mientras que *Aspergillus* y *Penicillium* son considerados hongos de almacenamiento ya que en esta etapa encuentran condiciones óptimas para su proliferación. Cuando los hongos de campo son aislados durante el almacenamiento indican condiciones deficientes de conservación del alimento ya que para su desarrollo necesitan una a_w mayor a la apropiada para esa etapa (Scudamore y Livesey, 1998; Akande y col., 2006; Amigot y col., 2006).

Como se mencionó antes, *Fusarium* contamina el cereal en el campo, pero por procesos tecnológicos como el secado, que buscan reducir la humedad para aumentar la vida útil de los productos agrícolas, el hongo puede ser destruido pero sus micotoxinas permanecen activas en el sustrato. Sin embargo, tampoco es de extrañar que se encuentren estos hongos en este cereal almacenado debido al mal procesamiento de los alimentos o por malas prácticas de saneamiento ambiental dando como consecuencia recontaminaciones posteriores causadas por vectores como el aire y los insectos (Carrillo, 2003). Por esto, con frecuencia se los ha aislado a partir de granos almacenados, donde son capaces de producir micotoxinas (Bueno, 2003). Además, se han encontrado que los cereales están entre los sustratos más adecuados para el desarrollo fúngico y la producción de micotoxinas. Como se describió anteriormente es conocido que *F. graminearum* es uno de los principales hongos aislados en climas templados y afecta principalmente al trigo y la cebada (Goswami y Kistler, 2004), lo que causa grandes pérdidas económicas debido a la reducción del rendimiento y calidad de los granos (Parry y col., 1995; Liddell 2003; Pirgozilev y col., 2003) y la producción de micotoxinas como zearalenona (ZEA) y tricotecenos. Los tricotecenos son altamente tóxicos para el ser humano, mientras que la ZEA es reconocida como un disruptor endócrino (IARC 1993). *F. graminearum* suele hallarse también en legumbres, frutas y pasturas (Carrillo, 2003). Además, ZEA esta ampliamente distribuida por todo el mundo sobre los cereales y piensos, encontrándose incluso en maíz destinado al consumo

humano (Cerveró y col., 2007), es considerada usualmente como un contaminante de los cereales almacenados y, si bien, la toxina puede ser producida en el campo durante el desarrollo de los cereales, la mayor producción de la toxina ocurre durante el almacenamiento de los alimentos, que transportan estos hongos, en ambientes con climas fríos y alta humedad (Hollinger y Ekperigin, 1999).

Se han publicado trabajos donde los cereales almacenados podrían tener mayor vida útil utilizando bacterias lácticas como biopreservadores, en este sentido Amigot (2009) obtuvo que la aplicación de *Lactobacillus buchmeri* BAL/7 o *Streptomyces* sp C/33-6 en silos experimentales permitió obtener silos de calidad regular en comparación de los silos control, donde su calidad fue mala. Además, todos esos silos regulares fueron aceptables en su evaluación final para el consumo animal. Por último, este investigador también observó que en las condiciones ensayadas *Lactobacillus buchmeri* BAL/7 resultó un agente de biocontrol más promisorio que *Streptomyces* sp C/33-6.

En este sentido, el kefir podría ser utilizado como biopreservador. Por otra parte, teniendo en cuenta la potencialidad probiótica y antifúngica del kefir (CYTED, 2010; León, 2013), se podría pensar en alimentos a base de cereales suplementados con kefir para alimentación humana.

El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad antifúngica de los sobrenadantes del kefir sobre *F. graminearum* y dilucidar los compuestos responsables de tal actividad, así como estudiar el efecto de dichos sobrenadantes sobre la producción de zearalenona como base para desarrollar un conservante biológico a partir de productos provenientes del kefir.

4.2.1 Optimización del medio de crecimiento de *F. graminearum*

En vista de la diversidad de medios de cultivos usados para el crecimiento de *F. graminearum* (Carrillo, 1995; Magnusson y Schnürer, 2001; Lavermicocca y col., 2002; Etcheverry y col., 2002; Onilude, A y col., 2005; Gerez y col., 2009), en la bibliografía se observó que distintos autores usaron diferentes medios para el crecimiento de *F. graminearum*. En este trabajo de tesis se comenzó probando el medio PDA, los resultados no fueron los esperados por eso se decidió hacer un estudio comparativo con 4 medios de cultivos. En la Tabla 4.2.1 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4.2.1: Optimización del medio de cultivo para crecimiento y esporulación de *F. graminearum* mediante recuento en cámara de Neubauer.

<i>F. graminearum</i> Cepa	Medio de Cultivo	Día 7 (conidios/ml)	Día 10 (conidios/ml)	Día 14 (conidios/ml)
Fg44	SNA	1,85 ± 0,50x10 ⁶	1,40 ± 0,36x10 ⁶	2,10 ± 0,70x10 ⁶
	PDA	<1x10 ⁴	<1x10 ⁴	<1x10 ⁴
	MEA	<1x10 ⁴	<1x10 ⁴	<1x10 ⁴
	CYA	1,10 ± 0,30x10 ⁶	1,42 ± 0,55x10 ⁶	0,90 ± 0,41x10 ⁶
Fg36	SNA	1,33 ± 0,25x10 ⁶	3,10 ± 0,60x10 ⁶	2,50 ± 0,41x10 ⁶
	PDA	<1x10 ⁴	<1x10 ⁴	<1x10 ⁴
	MEA	<1x10 ⁴	<1x10 ⁴	<1x10 ⁴
	CYA	0,85 ± 0,47x10 ⁶	0,92 ± 0,20x10 ⁶	2,20 ± 0,57x10 ⁶
Fg48	SNA	3,10 ± 0,41x10 ⁶	2,50 ± 0,36x10 ⁶	1,45 ± 0,71x10 ⁶
	PDA	<1x10 ⁴	<1x10 ⁴	<1x10 ⁴
	MEA	<1x10 ⁴	<1x10 ⁴	<1x10 ⁴
	CYA	0,40 ± 0,20x10 ⁶	1,70 ± 0,54x10 ⁶	1,60 ± 0,70x10 ⁶

Las cepas de *F. graminearum* fueron cultivadas en agares inclinados e incubados a 30°C. Los medios usados fueron: SNA (KNO₃ 0.1% p/v – KH₂PO₄ 0.1% p/v – MgSO₄.7H₂O 0.05% p/v – KCl 0.05% p/v – Glucosa 0.2% p/v – Sacarosa 0.2% p/v – Agar 1.5% p/v); MEA (extracto de malta (Biokar, Francia) 1% p/v – extracto de levadura (Biokar, Francia) 2% p/v – agar (Merck, Alemania) 2% p/v); PDA (agar papa dextrosa – Britania, Argentina); agar Czapek-Dox (1,5%) con 0,5% de extracto de levadura (CYA). Se tomó y se resuspendió la totalidad del crecimiento, según se indicó en materiales y métodos. Se realizaron recuentos en cámara de Neubauer. Los recuentos en cámara menores a 20 conidios no se consideraron por razones estadísticas.

Vale aclarar que en todos los casos hubo germinación y desarrollo fúngico pero no así esporulación. Esto se observó más claramente en el medio MEA y PDA donde se observaron micelios fuertemente adheridos al agar, donde se observaron escasos conidios al microscopio.

Los mayores recuentos, para las tres cepas, se observaron en el agar SNA, éstos estuvieron entre 1,33x10⁶ y 3,10x10⁶ conidios/ml. En los medios MEA y PDA, la esporulación fue menor, en algunos y casos y variable en otros, mientras que en el agar CYA se observó una menor concentración de conidios y se necesitó más tiempo de crecimiento. Estos datos se corroboraron con los recuentos en agar MEA realizados a partir de los recuentos en cámara (Figura 4.2.1). Se observó en disminución de los recuentos en medio MEA en comparación que sus respectivos recuento en cámara de

Neubauer, pero siempre dentro de mismo orden logarítmico. Esto se debe a que una pequeña proporción de los conidios perdieron su viabilidad.

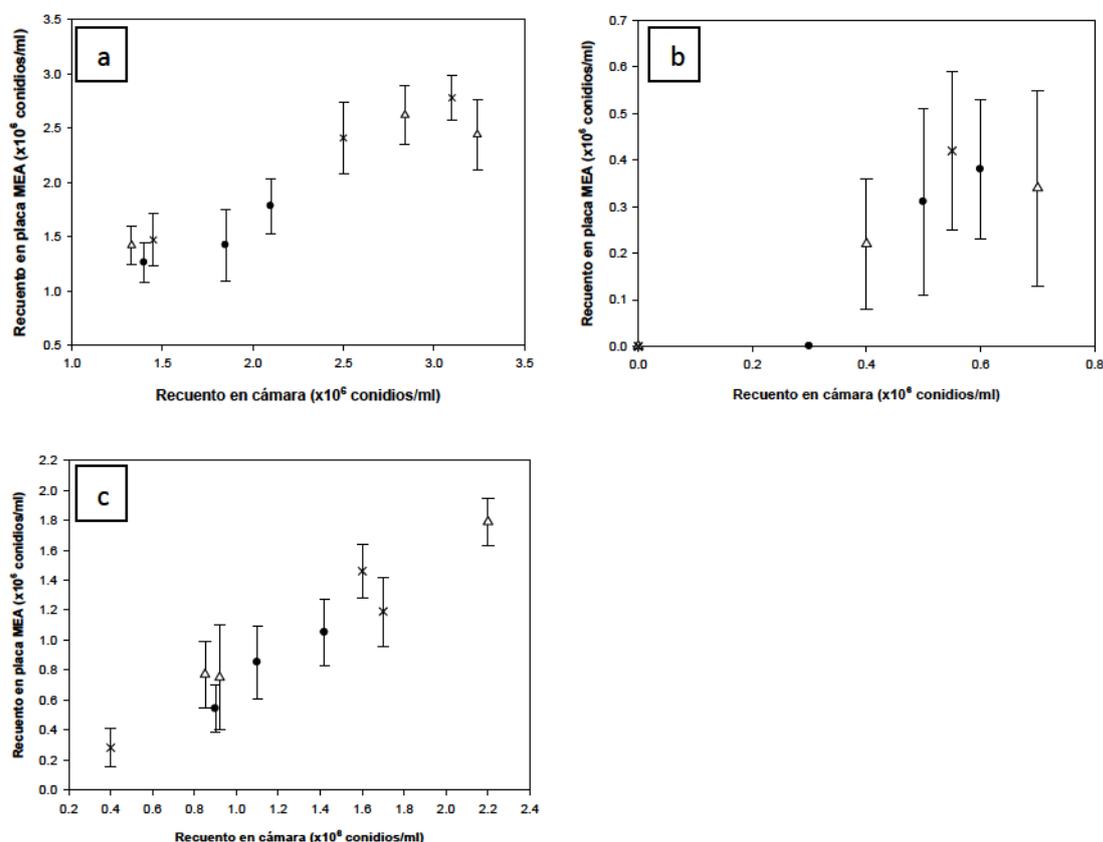


Figura 4.2.1 Comparación entre los recuentos de conidios totales por cámara de Neubauer en función de los conidios viables en placa MEA. Los hongos desarrollados en agar inclinado (a) SNA; (b) PDA y (c) CYA en función del recuento de hongos viables en placas MEA de *F. graminearum* (●) Fg44; (△) Fg36; (X) Fg48. En esta Figura no se muestran los recuentos en cámara de Neubauer obtenidos de hongos desarrollados en agar inclinado MEA y sus recuentos de hongos viables en agar MEA debido a que no hubo esporulación en el agar MEA inclinado.

Entonces, se seleccionó el medio SNA para continuar los estudios de optimización de obtención de conidios de *F. graminearum*.

Luego de este ensayo se decidió cultivar los hongos en agar SNA e incubarlos a 25°C en un receptáculo cerrado con luz ultravioleta y luz blanca (Fernando y col., 2000; Carrillo L., 2003) que permitió realizar ciclos alternados de 12 horas de luz blanca y luz ultravioleta (Fernando y col., 2000; Carrillo L., 2003). Estas son condiciones que favorecen la esporulación (Carrillo L., 2003). En la Tabla 4.2.2, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4.2.2: Optimización de la esporulación *F. graminearum* en medio SNA mediante recuento en cámara de Neubauer.

<i>F. graminearum</i> Cepa	Día 7 (conidios/ml)	Día 10 (conidios/ml)	Día 14 (conidios/ml)
Fg44	$5,10 \pm 0,32 \times 10^6$	$6,50 \pm 0,71 \times 10^6$	$5,25 \pm 0,43 \times 10^6$
Fg36	$8,25 \pm 0,35 \times 10^6$	$7,22 \pm 0,56 \times 10^6$	$8,34 \pm 0,88 \times 10^6$
Fg48	$6,62 \pm 0,48 \times 10^6$	$5,15 \pm 0,50 \times 10^6$	$7,63 \pm 0,42 \times 10^6$

Las cepas de *F. graminearum* fueron cultivadas en agar inclinado e incubadas según se indico anteriormente con ciclos de luz. Se realizaron recuentos en cámara de Neubauer.

Cuando se incubaron las cepas con periodos de luz blanca y luz UV (Tabla 4.2.2), se observaron aumentos significativos en los recuentos comparados con los hechos sin periodos de luz (Tabla 4.2.1). No se observaron diferencias significativas entre los recuentos a los diferentes tiempos de incubación indicando que a los 7 días los cultivos entran en fase estacionaria. En la Figura 4.2.2 se muestra la relación entre el recuento en cámara y el recuento de hongos viables en medio MEA de las cepas de *F. graminearum* incubadas a 25°C con ciclos de luz. Se aprecian mayores recuentos en estas condiciones, sugiriendo que el SNA es un medio adecuado para el crecimiento y esporulación de *F. graminearum*.

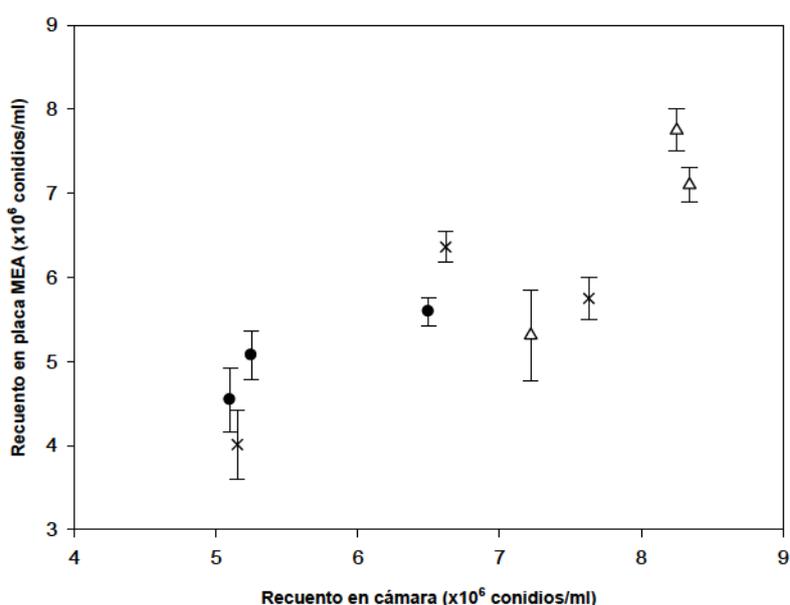


Figura 4.2.2 Comparación entre los recuentos de hongos totales por cámara de Neubauer obtenidos de hongos desarrollados en agar inclinado SNA con ciclos alternados de 12 horas de luz blanca y luz UV en función del recuento de hongos viables en placas MEA de *F. graminearum* (●) Fg44; (△) Fg36; (X) Fg48.

Por lo tanto, se decidió tomar como el medio de cultivo y condiciones de incubación más adecuados para el crecimiento y esporulación de *F. graminearum* el agar SNA de 7 días de incubación con ciclos alternados de 12 horas de luz blanca y luz ultravioleta.

4.2.2 Efecto de los sobrenadantes libres de células de permeado de suero fermentado con gránulos de kefir (SLC PSFG) sobre la germinación de diferentes cepas de *F. graminearum*

Los gránulos de kefir CIDCA AGK1 se utilizaron para fermentar permeado de suero (PS) a 30°C hasta llegar a determinados pH y se obtuvieron sus sobrenadantes según se indicó en materiales y métodos. Los conidios obtenidos según se indicó en el punto anterior se utilizaron para desafiar con los sobrenadantes del kefir.

La Fig. 4.2.3 muestra el efecto de los SLC PSFG obtenidos a diferentes pH (4,5; 4,0; 3,5) sobre la germinación de tres de cepas de *F. graminearum*. La menor absorbancia, por consiguiente, el mayor efecto inhibitor se obtuvo con los SLC PSFG sin diluir, a los pH 3,5 y 4,0.

Este mismo método se utilizó para estudiar la repuesta de las tres cepas a la presencia de los SLC PSFG en diferentes concentraciones. Los datos de absorbancia obtenidos se transformaron en porcentajes de inhibición de la germinación mediante la ecuación 1 ($\%RG = [(DO_{cp} - DO_{tto}) / DO_{cp}] \times 100$, donde DO_{cp} : Densidad óptica del control positivo; DO_{tto} : Densidad óptica del tratamiento), a los efectos de facilitar la comparación de los datos obtenidos con distintas cepas y pH.

La Tabla 4.2.3 muestra el porcentaje de inhibición fúngica de las tres cepas de *F. graminearum* desafiadas con los SLC PSFG a diferentes pH neutralizados o no y a distintas diluciones. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la ecuación 1.

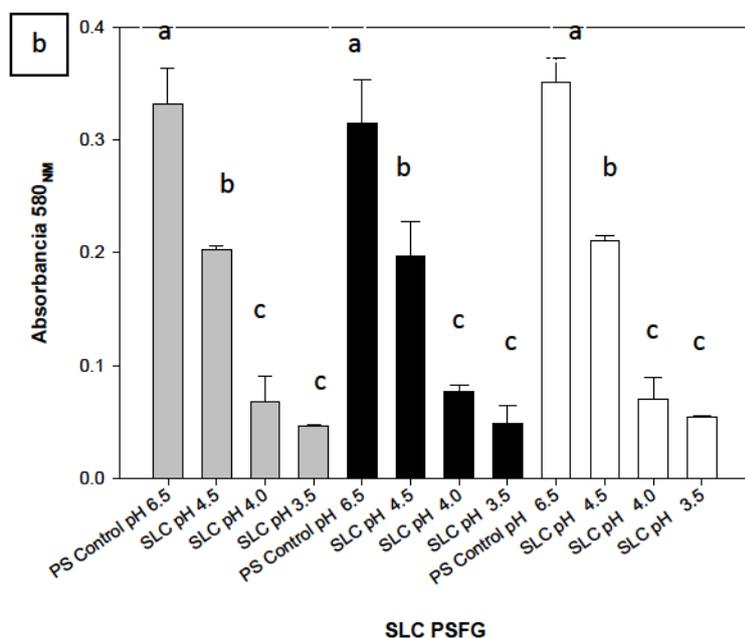
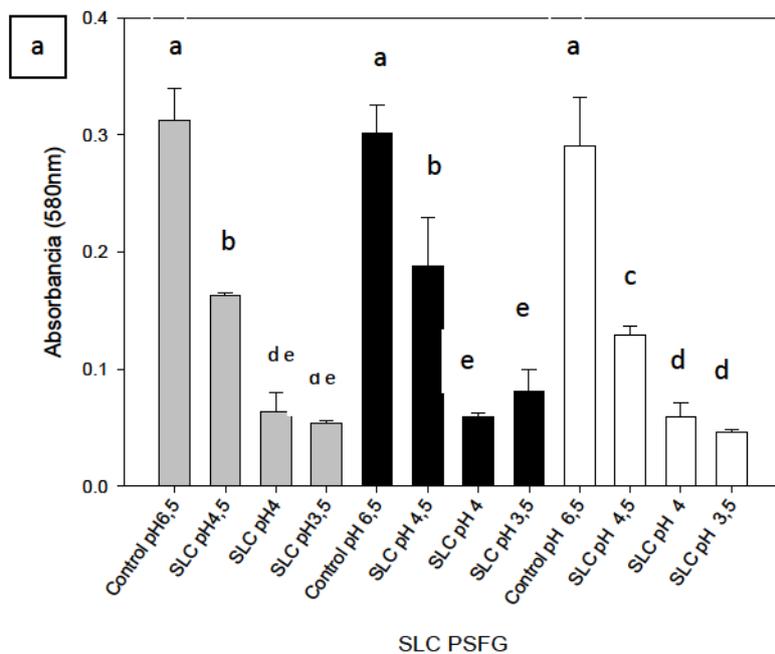


Fig. 4.2.3 Inhibición de la germinación de *F. graminearum* con los sobrenadantes libres de células obtenidos por la fermentación del permeado de suero con gránulos de kefir CIDCA AGK1 (SLC PSFG), a 30°C hasta distintos pH, sin diluir: (□) *F. graminearum* Fg44; (■) *F. graminearum* Fg36; (◻) *F. graminearum* Fg48. Cada tratamiento se realizó por quintuplicado con dos cultivos fúngicos independientes de cada cepa (a y b). Los controles se realizaron con PS sin fermentar (pH 6,5). Barras con diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas determinadas a través de ANOVA ($P < 0,05$).

Tabla 4.2.3. Porcentajes de inhibición de la germinación de *F. graminearum* con SLC PSFG.

pH SLC PSFG sin diluir	Porcentaje SLC PSFG v/v	pH final	Porcentaje Inhibición germinación Fg44	Porcentaje Inhibición germinación Fg36	Porcentaje Inhibición germinación Fg48	Ácido láctico (mM)	Ácido láctico sin disociar (mM)	Ácido acético (mM)	Ácido acético sin disociar (mM)
pH 3.5	Sin diluir	3,51	84,17 ± 1,05	75,75 ± 1,29	82,69 ± 0,74	169,35	109,29	50,22	47,37
	70%	3,63	73,36 ± 2,7	71,23 ± 2,11	76,41 ± 1,12	118,55	70,07	35,15	32,67
	50%	3,87	75,24 ± 0,98	65,33 ± 1,95	69,12 ± 1,59	84,68	38,45	25,11	22,19
	25%	4,30	42,32 ± 2,12	29,10 ± 1,24	31,24 ± 2,50	42,34	10,00	12,56	9,27
pH 4	Sin diluir	3,99	81,76 ± 0,45	80,20 ± 1,19	81,81 ± 1,79	86,71	33,07	34,64	29,41
	70%	4,15	71,15 ± 2,23	68,54 ± 1,16	72,62 ± 1,85	60,70	18,44	24,25	19,38
	50%	4,36	35,22 ± 2,48	22,78 ± 1,36	33,51 ± 1,74	43,36	9,20	17,32	12,31
	25%	4,98	18,66 ± 2,12	-2,49 ± 1,89	2,04 ± 2,21	21,67	1,31	8,66	3,21
pH 4,5	Sin diluir	4,50	64,95 ± 2,30	37,12 ± 2,40	44,38 ± 0,81	50,13	8,18	29,44	18,84
	70%	4,71	30,07 ± 2,49	2,09 ± 1,18	13,91 ± 1,66	35,09	3,77	20,61	10,78
	50%	4,92	-8,55 ± 2,88	-42,54 ± 1,43	-26,75 ± 1,24	25,07	1,73	14,72	5,94
pH 3.5	Sin diluir y neutralizado	4,00	75,47 ± 1,56	76,23 ± 1,73	68,83 ± 2,39	172,06	65,63	48,49	41,17
	Sin diluir y neutralizado	4,50	68,42 ± 1,89	72,12 ± 1,35	69,23 ± 1,58	168,00	27,41	50,22	32,15
	Sin diluir y neutralizado	5,00	30,34 ± 2,77	15,74 ± 1,43	41,24 ± 1,14	170,71	9,91	50,21	18,08

Los SLC PSFG se obtuvieron a los pH finales indicados en la tabla. Se determinó el porcentaje de inhibición de la germinación de *F. graminearum* por los SLC PSFG sin diluir, 70%, 50% y 25% v/v y por los SLC PSFG de pH 3,5 neutralizado a pH 4, 4,5 y 5. Los SLC PSFG se diluyeron con permeado de suero (PS) estéril resuspendido al 5%. Los SLC se neutralizaron con Na(OH) 0,1 N, estas neutralizaciones no modificaron los volúmenes de los SLC de forma significativa. Se calculó el porcentaje de inhibición de la germinación mediante la ecuación 1. Cada tratamiento se realizó por quintuplicado. Los datos correspondientes a los SLC PSFG sin diluir son los mismos que se presentaron en la Figura 4.3. Los datos correspondientes a las distintas diluciones y a los sobrenadantes neutralizados se realizaron por quintuplicado. Las concentraciones de ácido láctico y acético de los SLC PSFG sin diluir neutralizados o no se determinaron mediante HPLC. Las demás se calcularon.

En los SLC PSFG de menor pH se obtuvo la mayor inhibición fúngica. La mayor inhibición está directamente relacionada con el mayor contenido de ácidos orgánicos determinado por HPLC, y por lo tanto con la mayor concentración de ácidos no disociados. Los SLC PSFG a pH 3,5 y 4 al 100%, con mayores concentraciones de ácidos no disociados, produjeron una inhibición fuerte (>70%), mientras que los SLC a pH 4,5 al 100%, con la menor concentración de ácidos no disociados, produjeron una inhibición entre débil y moderada, según la cepa evaluada. También, a medida que se diluyeron los SLC, disminuyó la concentración de ácidos láctico y acético presentes, reflejándose en un menor poder inhibidor de los SLC. Además, los SLC PSFG a pH 4,5 y diluido al 50% v/v no produjeron inhibición, por el contrario, ocasionaron un efecto estimulante, lo cual se debe a la drástica disminución de los ácidos no disociados. Es decir, los hongos crecidos en estas condiciones tuvieron una absorbancia mayor que la de los controles.

Se seleccionaron los SLC PSFG más inhibitorios (a pH 3,5) y se realizaron neutralizaciones de los mismos para seguir estudiando la actividad antifúngica. En la Tabla 4.2.3 se observa que a medida que aumentó el pH por el agregado del álcali, los porcentajes de inhibición fúngica se redujeron. Esto se correlaciona con el descenso de la concentración de ácidos no disociados, a medida que aumenta el pH. Dichas concentraciones se redujeron de 109,29 mM y 47,37 mM de ácido láctico y acético sin disociar hasta: 65,63 mM y 41,17 mM de ácido láctico y acético sin disociar en los SLC PSFG neutralizados hasta pH 4; 27,41 mM y 32,15 mM de ácido láctico y acético sin disociar en los SLC PSFG neutralizados hasta pH 4,5; y 9,91 mM y 18,08 mM de ácido láctico y acético sin disociar en los SLC PSFG neutralizados hasta pH 5. Con la evaluación posterior de la actividad antifúngica de los estos SLC, encontramos que los SLC PSFG a pH 3,5 neutralizados hasta pH 4 y pH 4,5 produjeron porcentajes de inhibición entre moderada y fuerte. Mientras que el SLC llevado a pH 5 produjo una inhibición fúngica entre débil y negativa, según la cepa evaluada.

Se analizó el efecto inhibidor causado por la suma de ácidos orgánicos en cada SLC PSFG, y se graficó como porcentaje de inhibición de la germinación versus la suma de la concentración del ácido láctico y acético no disociado, tal como se observa en la Figura 4.2.4. Se observa que el aumento de la inhibición de la germinación es directamente proporcional al aumento de la concentración de los ácidos no disociados hasta 40 mM. A partir de esta concentración, el porcentaje de inhibición se estabiliza

entre 70% y 80% aún cuando la sumatoria de ácidos no disociados aumente desde 40 mM hasta 156,66 mM.

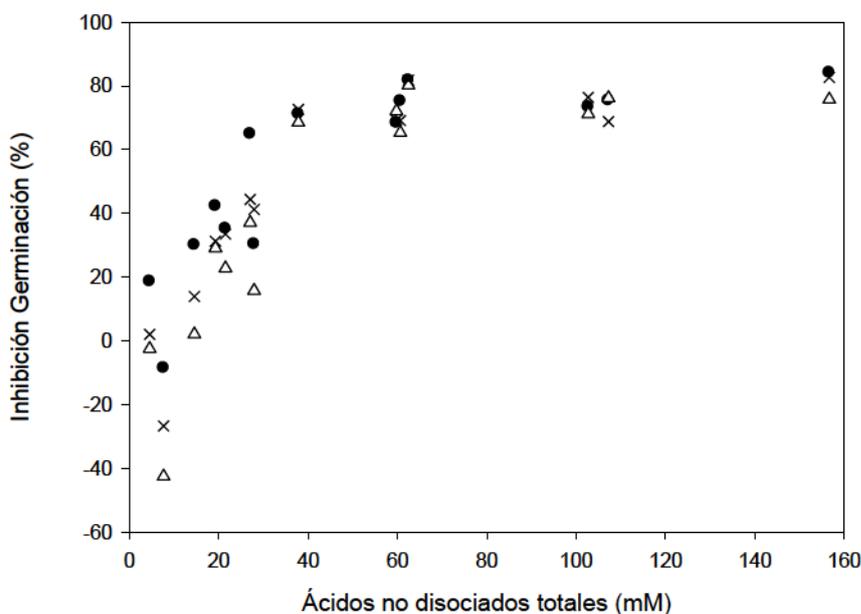


Fig. 4.2.4 Porcentaje de inhibición de la germinación de *F. graminearum* (●) Fg44; (Δ) Fg36; (X) Fg48 en función de los ácidos láctico y acético no disociados. Este gráfico fue realizado con los datos de inhibición de la germinación en función de la suma de los ácidos láctico y acético no disociados determinado para cada SLC PSFG tomados de la Tabla 4.1.

4.2.3 Evaluación de la actividad fungicida o fungistática de los SLC PSFG.

A partir de los ensayos de reducción de la germinación con SLC PSFG sin diluir, diluidos y neutralizados, se seleccionaron los SLC PSFG que produjeron una inhibición entre moderada y fuerte, es decir >40% y se tomaron una alícuota de 10 μ l de cada uno de los pocillos de seleccionados y se sembraron en placas de agar MEA, para determinar si el efecto inhibitorio de los SLC se debía a una actividad fungicida o fungistática. En los Tabla 4.2.4, se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 4.2.4: Crecimiento de *F. graminearum* en agar MEA luego de la exposición a SLC PSFG en ensayo de reducción de la germinación.

pH SLC PSFG sin diluir	Porcentaje SLC PSFG v/v	Crecimiento en agar de <i>F. graminearum</i> Fg44	Crecimiento en agar de <i>F. graminearum</i> Fg36	Crecimiento en agar de <i>F. graminearum</i> Fg48
pH 3.5	Sin diluir	(-)	(-)	(-)
	70%	(-)	(-)	(-)
	50%	(-)	(-)	(-)
	25%	(+)	*	*
pH 4	Sin diluir	(-)	(-)	(-)
	70%	(-)	(-)	(-)
	50%	*	*	*
	25%	*	*	*
pH 4,5	Sin diluir	(+)	*	(+)
	70%	*	*	*
	50%	*	*	*
pH 3.5	Sin diluir y neutralizado a pH final 4,0	(-)	(-)	(-)
	Sin diluir y neutralizado a pH final 4,5	(-)	(-)	(-)
	Sin diluir y neutralizado a pH final 5,0	*	*	(+)

A partir de los ensayos de reducción de la germinación con SLC PSFG sin diluir, diluidos y neutralizados, se seleccionaron los SLC PSFG que produjeron una inhibición entre moderada y fuerte, es decir >40% y se tomaron una alícuota de 10 µl de cada uno de los pocillos de seleccionados y se sembraron en placas de agar MEA. (+) Indica crecimiento fúngico en las placas de agar MEA, de a menos 1 de los 5 pocillos sembrados de cada SLC. (-) Indica que no hubo desarrollo fúngico en ninguno de las placas de agar MEA. *Los asteriscos señalan que la reducción de la germinación fue ≤ 40%, por lo que no se ensayaron las muestras. El ensayo se realizó dos veces, con los SLC PSFG de los dos ensayos de reducción de la germinación.

Con este estudio pudimos determinar que se necesitó, por los menos, 37,82 mM de ácidos no disociados totales (correspondiente a los SLC PSFG pH 4 al 70% v/v) para producir la muerte fúngica de las cepas estudiadas. Esta concentración de ácidos no disociados corresponde a 18,44 mM más 19,38 mM de ácido láctico y acético, respectivamente. En la Figura 4.2.5 se muestra el porcentaje de inhibición de la germinación en función de las concentraciones de ácidos totales no disociados presentes en los distintos SLC PSFG probados. El ovalo rojo en dicha Figura señala todos los SLC PSFG con actividad fungicida sobre las tres cepas estudiadas.

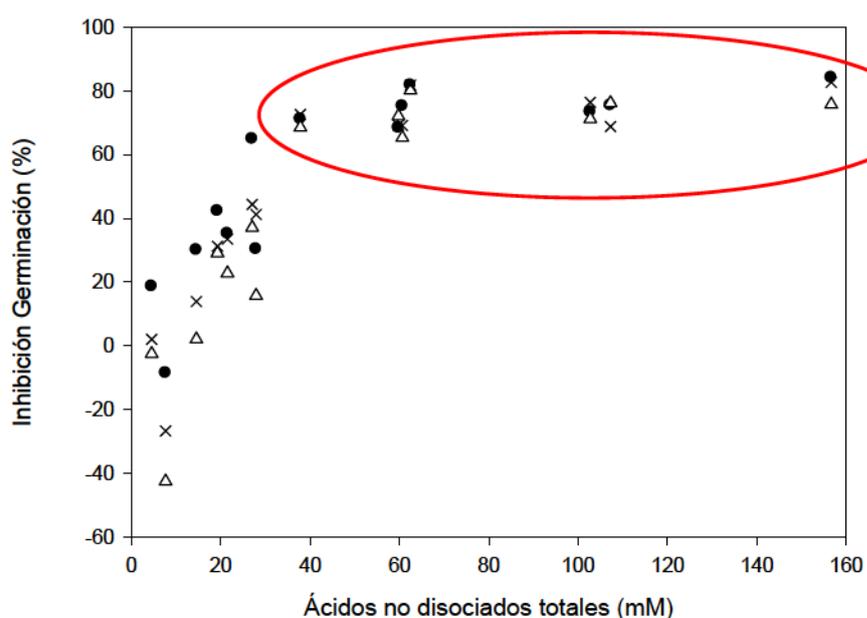


Fig. 4.2.5 Porcentaje de inhibición de la germinación de *F. graminearum* (●) Fg44; (Δ) Fg36; (X) Fg48 en función de los ácidos láctico y acético no disociados. Este gráfico fue realizado con los datos de inhibición de la germinación en función de la suma de los ácidos láctico y acético no disociados determinado para cada SLC PSFG tomados de la Tabla 4.2.1.

4.2.4 Efecto de los SLC PSFG sobre los parámetros de crecimiento de *F. graminearum* en medio sólido.

Con el objetivo de determinar el efecto de los SLC PSFG sobre los parámetros de crecimiento fúngico, velocidad de crecimiento y tiempo de latencia, se seleccionó un medio rico en nutrientes (medio MEA) al que se le adicionaron los SLC PSFG a distintos pH y concentraciones. La selección de este medio se basó en la capacidad de

crecimiento de los conidios de las cepas de *F. graminearum* tal como se observa en la Figura 4.2.2. Así mismo, esta decisión se basó en la posibilidad de poder comparar los resultados con los de otros investigadores ya que el medio MEA ha sido utilizado para estudios fúngicos (Molina y Giannuzzi, 1999; León y col., 2012).

Se realizaron ensayos de inhibición fúngica en placa con medio MEA suplementado o no con SLC PSFG a distintas concentraciones y pH. Estos estudios se realizaron con las cepas de *F. graminearum* y se determinó la velocidad de crecimiento (K_D) y el tiempo de latencia (Lag). En la Figura 4.2.6 se observan las curvas de crecimiento de las cepas de *F. graminearum* estudiadas desafiadas a distintas concentraciones de SLC PSFG. En la Figura 4.2.7 se representaron los parámetros de crecimiento, fase Lag y K_D , para cada tratamiento.

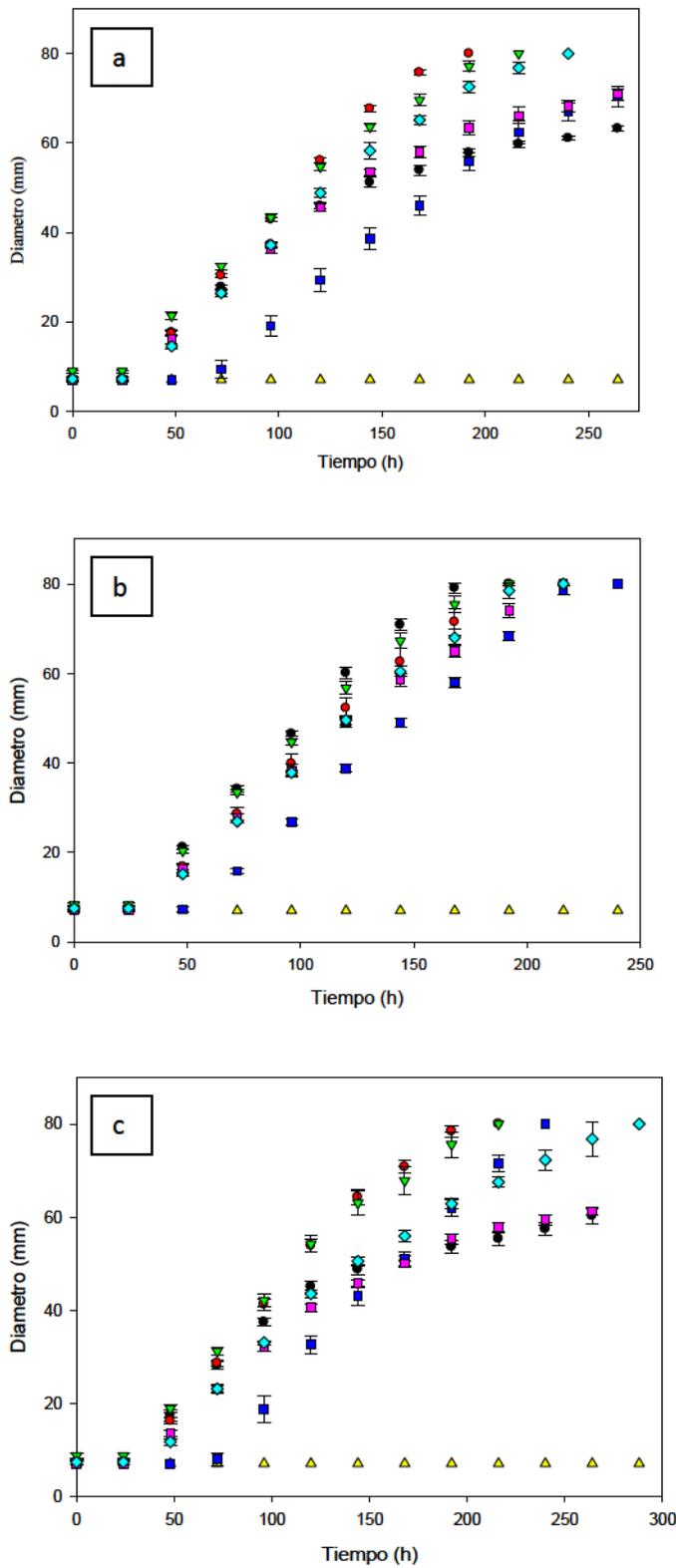


Figura 4.2.6. Curva de crecimiento de *F. graminearum* (a) Fg44, (b) Fg36 y (c) Fg48 en medio sólido MEA. ● MEA Control, ● MEA+70% PS esteril acidificado con HCl 3M hasta pH 3,5, ▼ MEA+75% PS esteril, ▲ MEA+70% SLC PSFG pH 3,5 al 70%, ■ MEA+50% SLC PSFG pH 3,5, ■ MEA+25% SLC PSFG pH 3,5, ◆ MEA+70% SLC PSFG pH 4,0.

Es importante destacar que se realizaron ensayos con dos controles diferentes para determinar el efecto del permeado de suero sobre el crecimiento fúngico. El primero consistió en el medio de crecimiento basal, MEA. Y el segundo fue realizado con medio MEA más el agregado de PS sin fermentar (concentración 70% v/v). Se observa que la fase de latencia del control MEA y del control MEA con permeado de suero fue entre 21,25 - 22,50 h y 21,83 - 24,24 h, respectivamente, según la cepa evaluada. Por la tanto, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la fase de latencia fúngica entre los dos controles. La velocidad de crecimiento fue entre 0,40 - 0,47 mm/h y 0,46 - 0,56 mm/h, según las cepas *F. graminearum* evaluadas crecidas en medio MEA y MEA con PS sin fermentar, respectivamente, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellas. También, hubo escasas diferencias entre los pH de los dos controles (6,35 y 6,28). Esto sugiere que el PS, por si mismo, no modificó significativamente los parámetros de crecimiento de las cepas de *F. graminearum* probadas. Se adicionaron al medio MEA los SLC PSFG en concentraciones seleccionadas según los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de la germinación.

Los ensayos con SLC PSFG se realizaron con los sobrenadantes obtenidos a pH 3,5 que se adicionaron a concentraciones finales de 70, 50 y 25%. Además se ensayó el SLC PSFG de pH 4,0 a concentración final 70% v/v. Como se observa en la Figura 4.2.6, las velocidades de crecimiento de las cepas de *F. graminearum* en medio MEA suplementado con SLC PSFG pH 3,5 al 50% o 25 % v/v y SLC a pH 4,0 al 70% no presentaron grandes diferencias con respecto a los controles. El único SLC PSFG que inhibió el crecimiento de las tres cepas por más de 720 h (tiempo total de duración del ensayo) fue el obtenido a pH 3,5 y adicionado al 70%.

El medio MEA suplementado con PS sin fermentar acidificado con HCl 3M hasta pH 3,5 y adicionado al 70% no modificó sustancialmente tanto la velocidad de crecimiento como los tiempos de latencia de las tres cepas a pesar de que el pH final del medio fue de 4,71, similar al producido por la adición de SLC PSFG pH 3,5 al 70% v/v (pH 4,55). Esto ratifica lo encontrado antes donde se observó que la adición al medio MEA del PS sin fermentar no modifica sustancialmente los parámetros de crecimiento fúngico de las tres cepas estudiadas. Además observamos que el efecto del descenso del pH, producido por un ácido fuerte, tampoco alteró significativamente el crecimiento fúngico.

Las mayores diferencias entre las cinéticas de crecimiento se observan en los tiempos de latencia. El medio MEA suplementado con SLC PSFG pH 3,5 al 70% produjo el mayor tiempo de latencia (>720 h), para las tres cepas. Cuando se disminuyó el volumen de SLC PSFG suplementado al 50% v/v, se observaron tiempos de latencia entre 48,49 – 66,71 horas, siendo la cepa Fg36 la que presentó el menor tiempo. Cuando se adicionaron SLC PSFG pH 3,5 al 25 % v/v y SLC a pH 4,0 al 70% no presentaron diferencias sustanciales con respecto a los controles.

A los efectos de comparar todos los datos obtenidos se calcularon las velocidades de crecimiento y los tiempos de latencia y se muestran en la Figura 4.2.7. Se observa que la adición de SLC PSFG en distintas concentraciones y pH finales no produjo grandes alteraciones de la velocidad de crecimiento salvo para el caso de la concentración fungicida donde se inhibió totalmente el crecimiento (Figura 4.2.7a). En la Figura 4.2.7b) se observa un claro aumento del tiempo de latencia para dos de las concentraciones ensayadas.

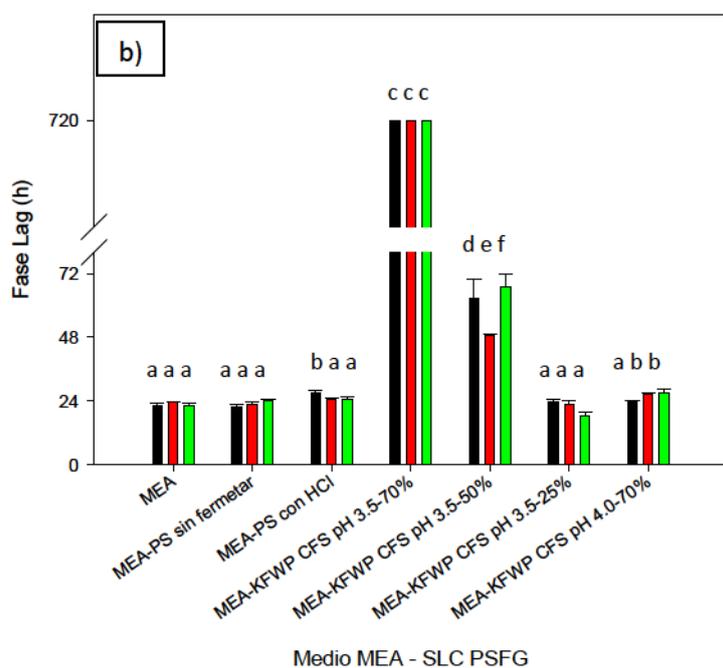
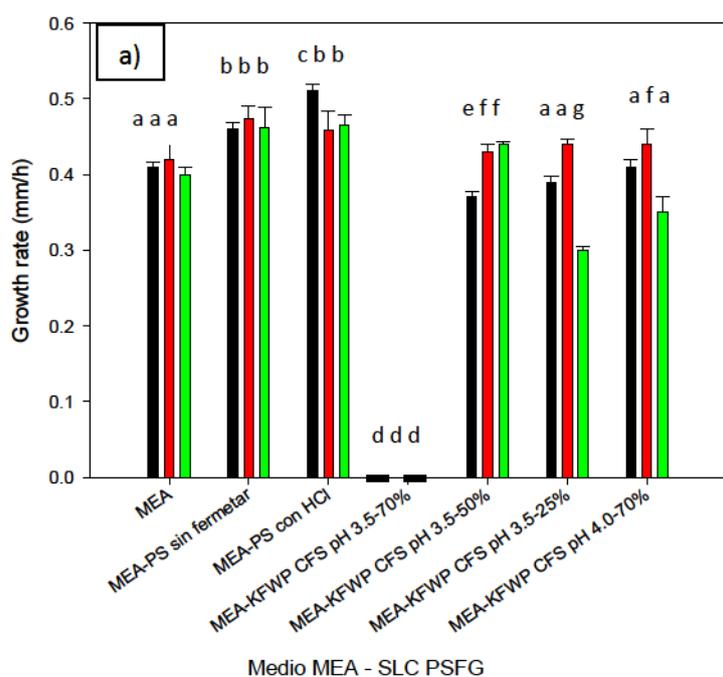


Fig. 4.2.7 Efecto de los SLC PSFG en diferentes concentraciones (v/v) en el medio MEA sobre: a) velocidad de crecimiento. b) fase de latencia de *F. graminearum* ■ Fg44; ■ Fg36; ■ Fg48.

En la Tabla 4.2.5 se presentan los pH finales y la concentración de ácidos totales no disociados en las placas calculadas con los datos de la Tabla 4.2.3 teniendo en cuenta la

dilución y pH final. En la Figura 4.2.8 se graficaron los parámetros de crecimiento obtenidos en la Figura 4.2.7 en función de la concentración total de ácidos no disociados (ácido láctico y acético) determinados por HPLC y calculados como se mencionó en materiales y métodos (ecuación 3.5) y teniendo en cuenta la dilución y en el pH final en las placas (Tabla 4.2.5).

Tabla 4.2.5. Concentración de ácidos no disociados totales y pH de las placas de MEA suplementadas o no con SLC PSFG.

Medio de cultivo	pH final medio	Concentración total de ácidos no disociados (mM)
MEA	6,35	ND
MEA-PS sin fermentar al 70% v/v	6,28	ND
MEA-PS acidificado con HCl 3M pH 3,5 al 70% v/v	4,71	ND
MEA-SLC PSFG pH 3,5 al 70% v/v	4,55	39,10
MEA-SLC PSFG pH 3,5 al 50% v/v	4,86	23,23
MEA-SLC PSFG pH 3,5 al 25% v/v	5,03	6,62
MEA-SLC PSFG pH 4,0 al 70% v/v	5,04	10,22

ND: no detectado. Los valores de concentración de ácidos no disociados se calcularon con las concentraciones de ácidos obtenidas por HPLC de la Tabla 4.2.3. Esto fue posible ya que para las curvas de crecimiento (Figura 4.2.6) se utilizaron los mismos SLC PSFG que los empleados para los experimentos de inhibición de la germinación (Tabla 4.2.3).

En la Figura 4.2.8 se observa que a la concentración de ácidos no disociados de 39,10 mM (SLC PSFG pH 3,5 al 70% v/v) produce la inhibición completa del crecimiento de las tres cepas evaluadas. Menores concentraciones de ácidos no disociados produjeron porcentajes de $IIIK_D$ entre -10 y 15% y la relación $LagT/LagC$ entre 1,04 y 2,98.

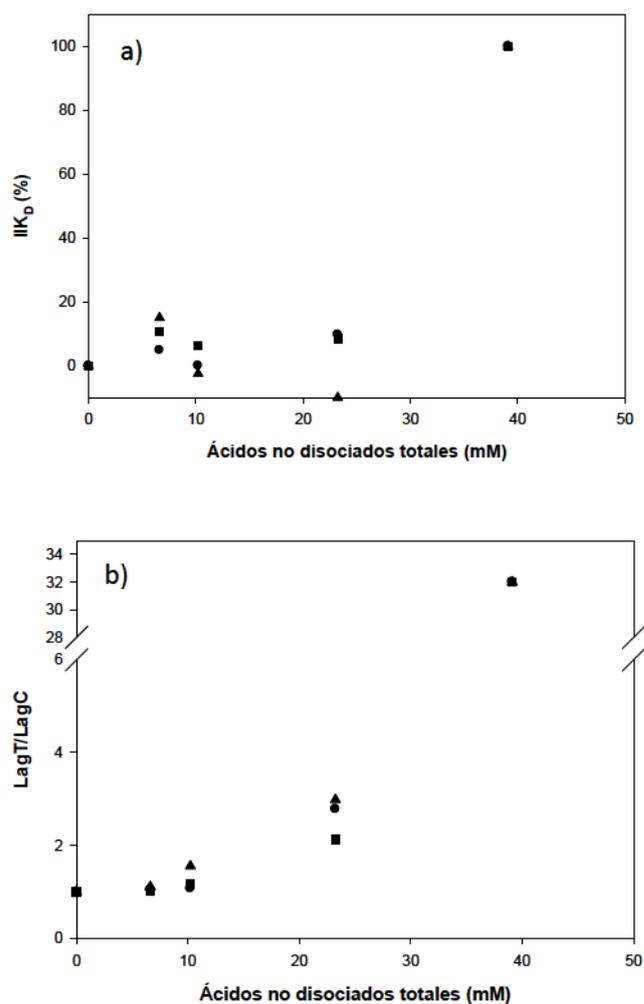


Figura 4.2.8 Parámetros de crecimiento de *F. graminearum* en función de la concentración de ácido láctico y acético no disociados. a) IIK_D y b) relación LagT/LagC de (●) *F. graminearum* Fg44; (■) Fg36 y (▲) Fg48. Los ácidos láctico y acético en los SLC PSFG fueron determinados mediante HPLC, a partir de éstos se calculó la concentración de ácidos no disociados. IIK_D y LagT/LagC fueron calculados como se indican en los Materiales y Métodos.

4.2.5 Evaluación de la actividad fungicida o fungistática de los SLC PSFG.

A los efectos de determinar si la inhibición del crecimiento se debía a una actividad fungicida o fungistática se sembraron placas de medio MEA suplementado o no con SLC PSFG de pH 3,5 al 70% y se incubaron a 30°C durante 7, 15 y 30 días y no se observó crecimiento en coincidencia con los datos ya presentados. Transcurrido ese tiempo, se tomaron muestras del centro de las placas (lugar donde se depositaron los conidios) según se detalló en materiales y métodos y se depositaron en placa con medio MEA sin suplementar y se incubaron durante 30 días. Los datos se muestran en la Figura 4.2.9 se observa que el SLC PSFG de pH 3,5 al 70% ejerció una actividad fungicida sobre la cepa *F. graminearum* Fg36. Los mismos datos se obtuvieron con *F. graminearum* Fg44 y Fg48. Este procedimiento no se realizó con el resto de los tratamientos porque hubo crecimiento fúngico.

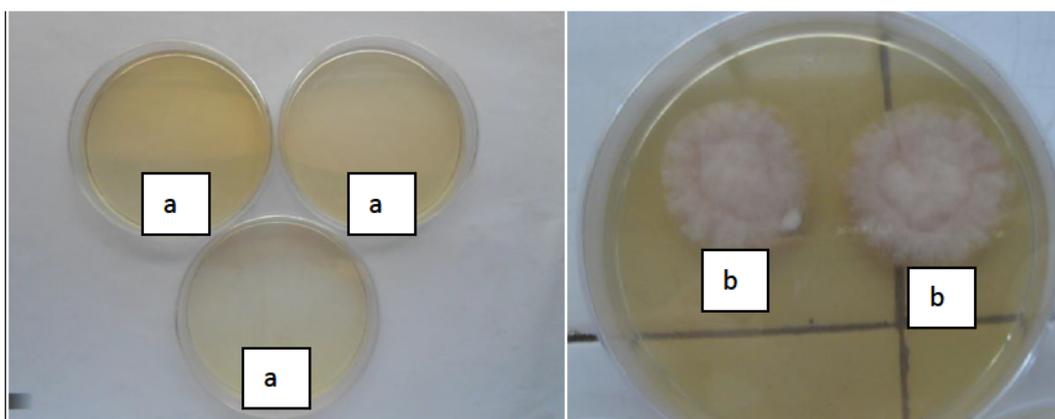


Figura 4.2.9: Placas de MEA inoculadas con *F. graminearum* Fg36 extraídas del medio MEA con SLC PSFG a pH 3,5 al 70% v/v (a). Controles de crecimiento positivo sembrados con conidios viables (b).

4.2.6 Comparación entre resultados obtenidos mediante los ensayos de reducción de la germinación y los ensayos de inhibición en placa.

Lo primero que debemos mencionar es que la capacidad fungicida de los SLC PSFG fue distinta según el método usado ya que el ensayo de reducción de la germinación es en medio líquido mientras que el ensayo de inhibición en placa es en medio sólido. Además, el medio de cultivo también es diferente, en el primero solo están presentes los SLC PSFG y los conidios mientras que en el segundo se adiciona un medio sólido rico en nutrientes (MEA).

Mediante el método de reducción de la germinación se encontró que los siguientes SLC PSFG tuvieron actividad fungicida: SLC PSFG a pH 3,5 sin diluir, al 70% v/v, 50% v/v y los SLC PSFG a pH 4,0 sin diluir y al 70%. Mientras que con el método de inhibición en placa observamos que solo el medio MEA con SLC PSFG a pH 3,5 al 70% v/v tuvo la capacidad fungicida.

Cuando correlacionamos la actividad fungicida con la concentración de ácidos totales no disociados se observa que en el ensayo de inhibición de la germinación los SLC PSFG obtenidos a pH 3.5 y los obtenidos a pH 4,0 sin diluir, todos con actividad fungicida, contienen más de 60 mM de ácidos no disociados. El SLC PSFG obtenido a pH 4,0 y utilizado al 70% presentó actividad fungicida con una concentración de ácidos totales no disociados de 37,82 mM. Esta concentración es muy similar a la única concentración fungicida observada en el método de inhibición en placa, 39,10 mM de ácidos totales no disociados, correspondiente a los SLC obtenidos a pH 3,5 y utilizados al 70%. Datos que indican la buena correlación entre los métodos. En la Tabla 4.2.6 se muestra un resumen de las principales características observadas al utilizar ambos métodos.

Tabla 4.2.6. Comparación entre ensayo de de reducción de la germinación y el ensayo de inhibición en placa.

Características	Reducción de la germinación	Inhibición en placa
Duración del ensayo	2 días	30 días
Material requerido	pequeños volúmenes de SLC PSFG (1 ml por ensayo quintuplicado)	Grandes volúmenes de SLC PSFG (45 ml por ensayo triplicado)
Información obtenida	-No brinda información sobre los parámetros de crecimiento fúngico -Método menos realista ya que interactúan solo los conidios + SLC	-Brinda información sobre los parámetros de crecimiento fúngico -Método más realista ya que interactúan los conidios + SLC + matriz + nutrientes

Como conclusión general se puede decir que los dos métodos son válidos y se pueden aplicar de acuerdo a la información deseada siendo el más completo el de inhibición en placa. El método de reducción de la germinación se propone como un método de aproximación o "screening".

4.2.7 Efecto de los ácidos láctico y acético puros y sus mezclas sobre *F. graminearum*

En vista de la capacidad inhibitoria de los sobrenadantes del kefir determinada previamente y teniendo en cuenta que los ácidos láctico y acético son dos de los principales metabolitos producidos por los microorganismos presentes en los gránulos durante la fermentación. Se llevaron a cabo ensayos para determinar la capacidad antifúngica de dichos ácidos puros individuales y sus mezclas frente a las cepas de *F. graminearum* probadas previamente para corroborar si dicha actividad se debió solo a estos ácidos o intervienen otros metabolitos producidos por una comunidad microbiana tan compleja como la presente en los gránulos de kefir.

4.2.7.a) Efecto de los ácidos láctico y acético puros y sus mezclas sobre la reducción de la germinación de *F. graminearum*

Teniendo en cuenta las características observadas con los dos métodos descritos, se decidió comenzar los estudios de los ácidos orgánicos puros mediante el ensayo de reducción de la germinación debido a su facilidad y rapidez. En la Tabla 4.2.7 se presentan los porcentajes de inhibición de la germinación obtenidos al desafiar las tres cepas de *F. graminearum* con distintas concentraciones de ácidos acético (Parte A) y láctico (Parte B). Se observó que el porcentaje de inhibición ascendió a medida que aumentó la concentración de ácidos no disociados. Los hongos presentaron mayor resistencia al ácido láctico que al acético. A partir de 2,73 mM de ácido acético no disociado se obtuvieron porcentajes de inhibición moderados. Las concentraciones siguientes produjeron porcentajes de inhibición fuerte (11 de 12 casos). Mientras que 5,96 mM de ácido láctico no disociado (la menor concentración probada) produjo solo inhibición moderada sobre las tres cepas. Al subir la concentración de dicho ácido hasta 24,28 mM, se observó una inhibición entre moderada y fuerte, dependiendo de la cepa. Cuando se probaron concentraciones mayores de ácido láctico no disociado ($\geq 49,55$ mM), se observaron cambios en el medio de cultivo, haciéndolo turbio, dando como resultado porcentajes de inhibición bajos o negativos.

Tabla 4.2.7. Inhibición de la germinación de *F. graminearum* con distintas concentraciones de ácido acético y láctico.

Parte A: ácido acético

Ácido acético calculado (mM)	Ácido acético medido por HPLC (mM)	pH final	Ácido acético no disociado (mM)	Porcentaje Inhibición germinación Fg44	Porcentaje Inhibición germinación Fg36	Porcentaje Inhibición germinación Fg48
6,93	7,79	5,51	1,15	39,62 ± 4,19	28,62 ± 5,56	45,14 ± 2,16
10,39	10,06	5,18	2,73	53,88 ± 3,63	56,59 ± 8,66	58,83 ± 1,98
13,86	15,71	4,98	5,82	71,69 ± 2,22	75,54 ± 1,45	63,95 ± 1,40
17,32	19,84	4,87	8,56	85,37 ± 0,77	81,23 ± 0,92	81,44 ± 0,78
20,78	25,47	4,70	13,47	81,87 ± 0,70	81,90 ± 0,61	80,39 ± 0,95
27,71	30,89	4,58	18,43	81,26 ± 0,85	82,13 ± 0,93	81,27 ± 0,64

Parte B: ácido láctico

Ácido láctico calculado (mM)	Ácido láctico medido por HPLC (mM)	pH final	Ácido láctico no disociado (mM)	Porcentaje Inhibición germinación Fg44	Porcentaje Inhibición germinación Fg36	Porcentaje Inhibición germinación Fg48
27,10	33,21	4,45	5,96	55,48 ± 5,08	48,34 ± 12,45	57,89 ± 5,03
54,19	56,29	3,91	24,28	72,20 ± 1,05	60,26 ± 1,74	73,76 ± 2,33
81,29	88,91	3,69	49,55	24,61 ± 5,17	-3,74 ± 6,22	36,59 ± 2,80
108,38	122,33	3,44	84,56	-6,60 ± 10,48	-64,23 ± 12,36	-48,37 ± 13,64
135,48	139,59	3,32	104,26	-45,97 ± 10,45	-116,62 ± 15,59	-29,90 ± 16,45

Los ácidos orgánicos se adicionaron al caldo extracto de malta (MEC), el cual se sirvió en los pocillos de la policubeta. Luego, se inocularon 10 µl suspensión de conidios (10⁵ conidios/ml). La placa se incubó 48 h a 30°C y se leyó la DO_{580NM}. Mediante la ecuación 3.2 (%IG= [(DO_{cp}-DO_{tto})/DO_{cp}] \times 100, donde: DO_{cp}: Densidad óptica del control positivo y DO_{tto}: Densidad óptica del tratamiento), se calculó el porcentaje de inhibición de la germinación. La concentración de ácidos se corroboró por HPLC, según se indicó en materiales y métodos. Cada tratamiento se realizó por quintuplicado y el ensayo se realizó dos veces.

Para completar los estudios con estos ácidos y salvar el problema ocasionado por las altas concentraciones de ácido láctico, se tomaron muestras de todos los pocillos que produjeron inhibición entre moderada y fuerte, y adicionalmente se agregaron muestras de todos los pocillos de medio con concentraciones de ácido láctico no disociado $\geq 49,55$ mM y se sembraron en placas de medio MEA sin ácidos orgánicos (Tabla 4.2.8). En este ensayo fue muy importante sembrar los caldos MEC adicionado con ácidos orgánicos en las placas de agar MEA, ya que allí observamos que a pesar de producir una inhibición fuerte, cuando se sembraron en el agar observamos que 5,82 mM de ácido acético no disociado no tuvo un efecto fungicida sobre la cepa Fg44.

Las cepas Fg44 y Fg48 fueron más resistentes al ácido acético que la cepa Fg36, mientras que la cepa Fg36 fue más resistente al ácido láctico que las otras dos.

Además, concentraciones de ácido láctico no disociado $\geq 49,55$ mM mostraron actividad fungicida sobre las tres cepas, este dato no se puede comparar ya que la turbidez que produce el ácido láctico, en altas concentraciones, es un artefacto que limita el uso del método.

Tabla 4.2.8 Crecimiento de *F. graminearum* en agar MEA luego de la exposición a un medio con ácidos láctico o acético en ensayo de reducción de la germinación.

Ácido láctico no disociado (mM)	Ácido acético no disociado (mM)	Crecimiento en agar de <i>F. graminearum</i> Fg44	Crecimiento en agar de <i>F. graminearum</i> Fg36	Crecimiento en agar de <i>F. graminearum</i> Fg48
1,15		(*)	(*)	(+)
2,73		(+)	(+)	(+)
5,82		(+)	(-)	(+)
8,56		(-)	(-)	(-)
13,47		(-)	(-)	(-)
18,43		(-)	(-)	(-)
	5,96	(+)	(+)	(+)
	24,28	(-)	(+)	(-)
	49,55	(-)	(-)	(-)
	84,56	(-)	(-)	-(-)
	104,26	(-)	(-)	(-)

(+) Indica crecimiento fúngico en las placas de agar MEA, de al menos 1 de los 5 pocillos sembrados de cada SLC. (-) Indica que no hubo desarrollo fúngico ninguno de las placas de agar MEA incubadas durante un periodo de 30 días. Los asteriscos (*) indican que la reducción de la germinación fue $\leq 40\%$, por lo que no se tomaron muestras para sembrar en las placas de MEA. El ensayo se realizó dos veces en concordancia con los ensayos de inhibición de la germinación.

Debido a que hubo distintas concentraciones de ácidos con capacidad fungicida, se seleccionó la menor en cada caso y se la llamo concentración fungicida mínima (CFM) a la menor concentración de ácido láctico o acético capaz de impedir la germinación y el desarrollo fúngico.

Se encontró que la CFM de los dos ácidos estudiados fue diferente según la cepa. Con el objeto de resumir y clarificar los resultados obtenidos, se presenta la Tabla 4.2.9. En esta se observa que las cepas Fg44 y Fg48 fueron más resistentes al ácido acético que la cepa Fg36, mientras que la cepa Fg36 fue más resistente al ácido láctico que las otras dos.

Tabla 4.2.9. CFM de ácido láctico y acético sobre *F. graminearum*

<i>F. graminearum</i>	CFM Ácido Acético no disociado	CFM Ácido Láctico no disociado
Fg44	8,56 mM	24,28 mM
Fg36	5,82 mM	49,55 mM
Fg48	8,56 mM	24,28 mM

A los fines de comparar los efectos producidos por ácidos no disociados sobre la reducción de la germinación se graficaron los datos obtenidos (Figura 4.2.10). Aquí se aprecia que hay un relación lineal entre el porcentaje de inhibición de las tres cepas con la concentración de ácido acético no disociado (con un ajuste $R^2= 0,80$) hasta una concentración de 8,56 mM (Figura 4.2.9a). Esta comparación no pudo realizarse en el caso del ácido láctico debido a las alteraciones producidas por dicho ácido sobre el medio de cultivo.

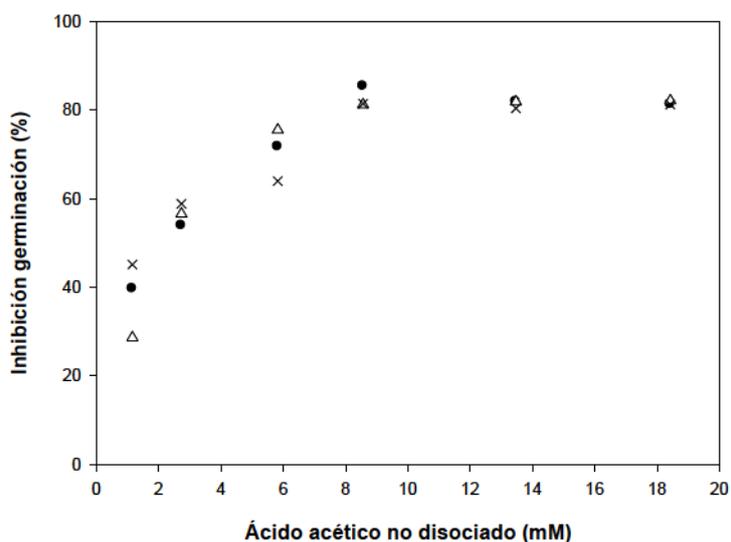


Figura 4.2.10 Fig. 4.4 Porcentaje de inhibición de la germinación de *F. graminearum* (●) Fg44; (△) Fg36; (X) Fg48 en función del ácido acético no disociado. Este gráfico fue realizado con los datos de inhibición de la germinación en función de la concentración de acético no disociado determinado para cada medio adicionado con la concentración de ácido tomada de la Tabla 4.2.7.

A continuación se continuó el estudio con diferentes mezclas de ácidos láctico y acético para estudiar el efecto sinérgico de los dos ácidos orgánicos. Para seleccionar las concentraciones se realizó la técnica del tablero.

Debido a los resultados obtenidos por León Peláez y col. (2012) sobre *Aspergillus flavus*, ha demostrado que el efecto de los dos ácidos es sinérgico, y además existe otra bibliografía que demuestra el efecto sinérgico de otras mezclas de ácidos (Corsetti y col., 1998; Lavermicocca y col., 2000) entonces se decidió que las concentraciones de ácidos más altas (1 y 2 veces la CIM de cada ácido) no serían ensayadas. Las concentraciones probadas se exponen en la Tabla 4.2.10.

Para la selección de las concentraciones de mezclas que se usaron en este ensayo es esencial determinar las CFM de cada ácido. Por lo tanto se eligió la mínima concentración de ácido láctico y acético capaz de mostrar actividad fungicida sobre las cepas probadas. Entonces se tomó la concentración de 88,91 mM y 19,84 mM de ácido láctico y acético, respectivamente. Distintas fracciones de esas concentraciones (0,06; 0,12; 0,25 y 0,50 veces CFM cada ácido) son las que se muestran en la Tabla 4.2.10.

Tabla 4.2.10: Mezclas de ácidos láctico y acético a probar en ensayo de inhibición de la germinación sobre *F. graminearum*.

Ácido Láctico (mM) Ácido Acético (mM)	5,33	10,67	22, 23	44, 46
1,19	0,18A+0,11L (0,29)	0,36A+0,55L (0,91)	0,68A+3,53L (4,21)	0,89A+14,80L (15,69)
2,38	0,46A+0,15L (0,61)	0,81A+0,64L (1,45)	1,35A+3,47L (4,82)	1,74A+14,49L (16,23)F1
4,96	1,30A+0,22L (1,52)	1,95A+0,82L (2,77)	2,94A+3,86L (6,80)	3,71A+15,22L (18,93)F3
9,92	3,51A+0,34L (3,85)	4,45A+1,02L (5,47)	5,99A+3,89L (9,88)F3	7,45A+15,91L (23,36)F3

A: concentración de ácido acético no disociado; L: concentración de ácido láctico no disociado. Entre paréntesis su muestra la concentración de ácidos no disociados totales. Los valores son un promedio de las concentraciones de ácidos no disociados determinados para el ensayo de cada cepa. F1: concentración de ácidos no disociados totales con actividad fungicida sobre *F. graminearum* Fg44; F3: concentración de ácidos no disociados totales con actividad fungicida sobre las tres cepas de *F. graminearum*.

Con las mezclas de ácidos detalladas en la Tabla 4.2.10 se realizaron los ensayos de inhibición de germinación con las tres cepas de *F. graminearum* y los resultados se presentan en la Figura 4.2.11.

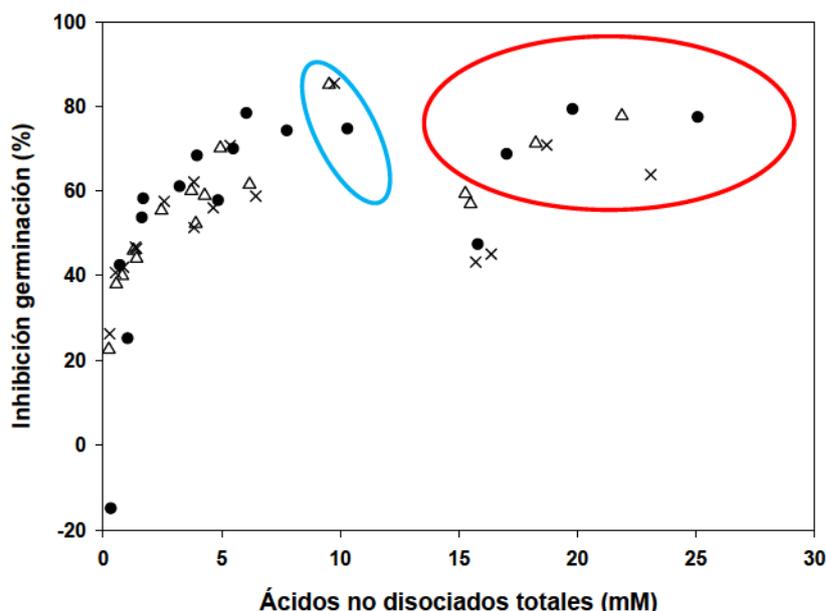


Figura 4.2.11 Porcentaje de inhibición de la germinación de *F. graminearum* (●) Fg44; (△) Fg36; (X) Fg48 en función de los ácidos láctico y acético no disociados presentes en las mezclas de ácido láctico y acético.

Se observaron dos comportamientos. La cepa Fg36 y Fg48 presentaron mayor resistencia a la mezcla de ácidos que la cepa Fg44, ya que se requirió, al menos, entre 18,93 mM de ácidos totales no disociados para producir un acción fungicida mientras que para la cepa Fg44 fue suficiente 16,23 mM de ácidos totales no disociados, siempre que el principal ácido no disociado en mezcla fue el ácido láctico (Figura 4.2.11 círculo rojo). Por otra parte, cuando hubo mayor concentración de ácido acético no disociado que láctico en la mezcla, una concentración de ácidos no disociados de entre 9,88 mM resultaron fungicidas (Figura 4.2.11 círculo azul).

Es decir, en las cepas más resistentes se encontraron tres mezclas con capacidad fungicida, una mezcla con 4,96 mM: 44,46 mM ácido acético: ácido láctico (con 18,93 mM de ácidos no disociados totales), otra mezcla con 9,92 mM: 22,23 ácido acético: ácido láctico (con 9,88 mM de ácidos no disociados totales) y la última con 9,92 mM:

44,46 ácido acético: ácido láctico (con 23,36 mM de ácidos no disociados totales). Mientras que la cepa Fg44 fue muerta con las mismas mezclas que las dos cepas anteriores y además, con la mezcla de 2,38 mM: 44,46 ácido acético: ácido láctico (16,23 mM de ácidos no disociados totales).

Se observó que el ensayo de inhibición de la germinación, por sí solo, brinda información incompleta ya que dos mezclas de ácidos (4,96 mM: 44,46 mM ácido acético: ácido láctico y la siguiente con 9,92 mM: 10,67 mM ácido acético: ácido láctico), cuyas concentraciones de ácidos totales no disociados son 18,93 mM y 5,47 mM respectivamente, produjeron sobre la cepa Fg36 una inhibición de la germinación fuerte, pero una fue fungicida y la otra no. Algo similar se observó con la cepa Fg48.

Por otra parte, el sinergismo producido por la mezcla de ácidos fue expresado matemáticamente mediante el Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (Índice CIF), el cual fue calculado como la suma de los índices FIC de cada ácido. Si la suma entre ambos ácidos es igual a 1, el efecto de los ácidos es aditivo; si la suma es menor a 1, el efecto de los ácidos es sinérgico y si la suma es mayor a 1, los analitos tienen un efecto antagónico entre ellos. Cabe resaltar que el Índice FIC de ambas mezclas de ácidos frente a las cepas más resistentes fue de 0,75, esto demuestra el efecto sinérgico que tienen ambos ácidos sobre la inhibición de *F. graminearum*. Sin embargo, la mezcla de 4,96 mM: 44,46 mM ácido acético: ácido láctico, respectivamente, necesitó mayor concentración de ácidos no disociados totales (18,93 mM, según la cepa) que la mezcla 9,92 mM: 22,23 mM ácido acético: ácido láctico (9,88 mM).

Si observamos con detenimiento la composición de la mezcla apreciamos que en la mezcla de 4,96 mM: 44,46 mM ácido acético: ácido láctico, alrededor del 80% de los ácidos no disociados son ácido láctico mientras que la mezcla de 9,92 mM: 22,23 mM ácido acético: ácido láctico, alrededor del 60% pertenece al ácido acético. Esto demuestra la mayor capacidad antifúngica del ácido acético sobre el láctico sobre las cepas de *F. graminearum* probadas.

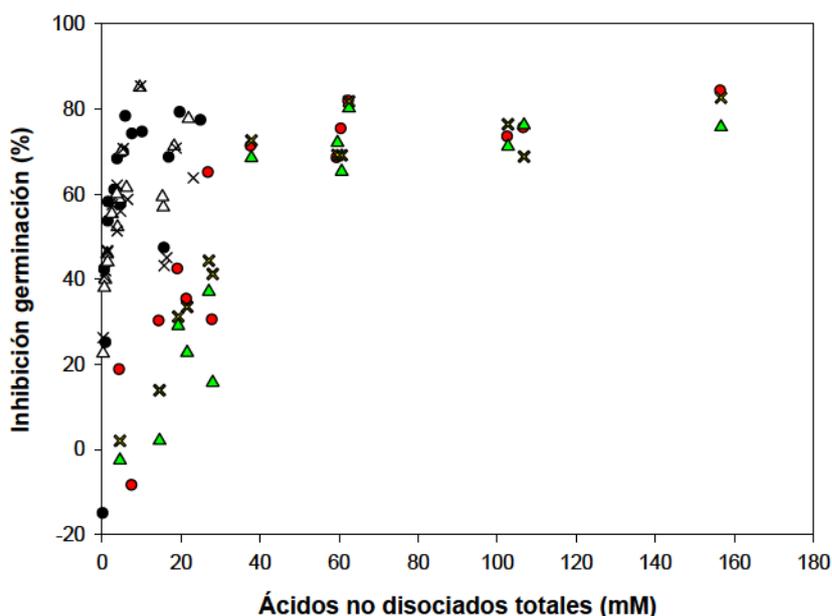


Figura 4.2.12. Comparación entre porcentaje de inhibición de la germinación de *F. graminearum* (●) Fg44; (△) Fg36; (X) Fg48 en función de los ácidos láctico y acético no disociados presentes en las mezclas de ácido láctico y acético con porcentaje de inhibición de la germinación de *F. graminearum* (●) Fg44; (▲) Fg36; (X) Fg48 desafiados a los diferentes SLC PSFG ensayados.

En la Figura 4.2.12 se muestra una comparación entre los porcentajes de inhibición de germinación en función de la concentración de ácidos no disociados totales de las mezclas de ácidos láctico y acético realizadas artificialmente y las mezclas de ácidos láctico y acético presentes en los SLC PSFG. Se observó que se necesitan mayor concentración de ácidos no disociados en los SLC PSFG para producir altos porcentajes de inhibición. Recordemos que el SLC PSFG con menor concentración de ácidos no disociados totales con poder fungicida tuvo 37,82 mM de ácidos no disociados totales y perteneció al SLC PSFG de pH 4,0 diluido al 70% v/v. Mientras que las mezclas de ácidos fueron fungicidas con 18,93 mM o 9,88 mM ácidos no disociados totales, según que ácido predomine en la mezcla.

4.2.7.b) Efecto de los ácidos láctico y acético puros y sus mezclas sobre los parámetros de crecimiento de *F. graminearum*

Se realizaron ensayos de inhibición en placa con ácidos láctico y acético puros en el medio MEA sin SLC PSFG. En la Figura 4.2.13, se muestran las curvas de crecimiento donde las cepas de *F. graminearum* fueron expuestas a distintas concentraciones de

dichos ácidos. Al igual que lo producido por los SLC PSFG, el principal parámetro de crecimiento afectado por los ácidos es la fase de latencia. No se observó crecimiento fúngico de ninguna de las tres cepas cuando estas fueron expuestas a un medio con 8,56 mM de ácido acético no disociado y 49,55 mM de ácido láctico no disociado.

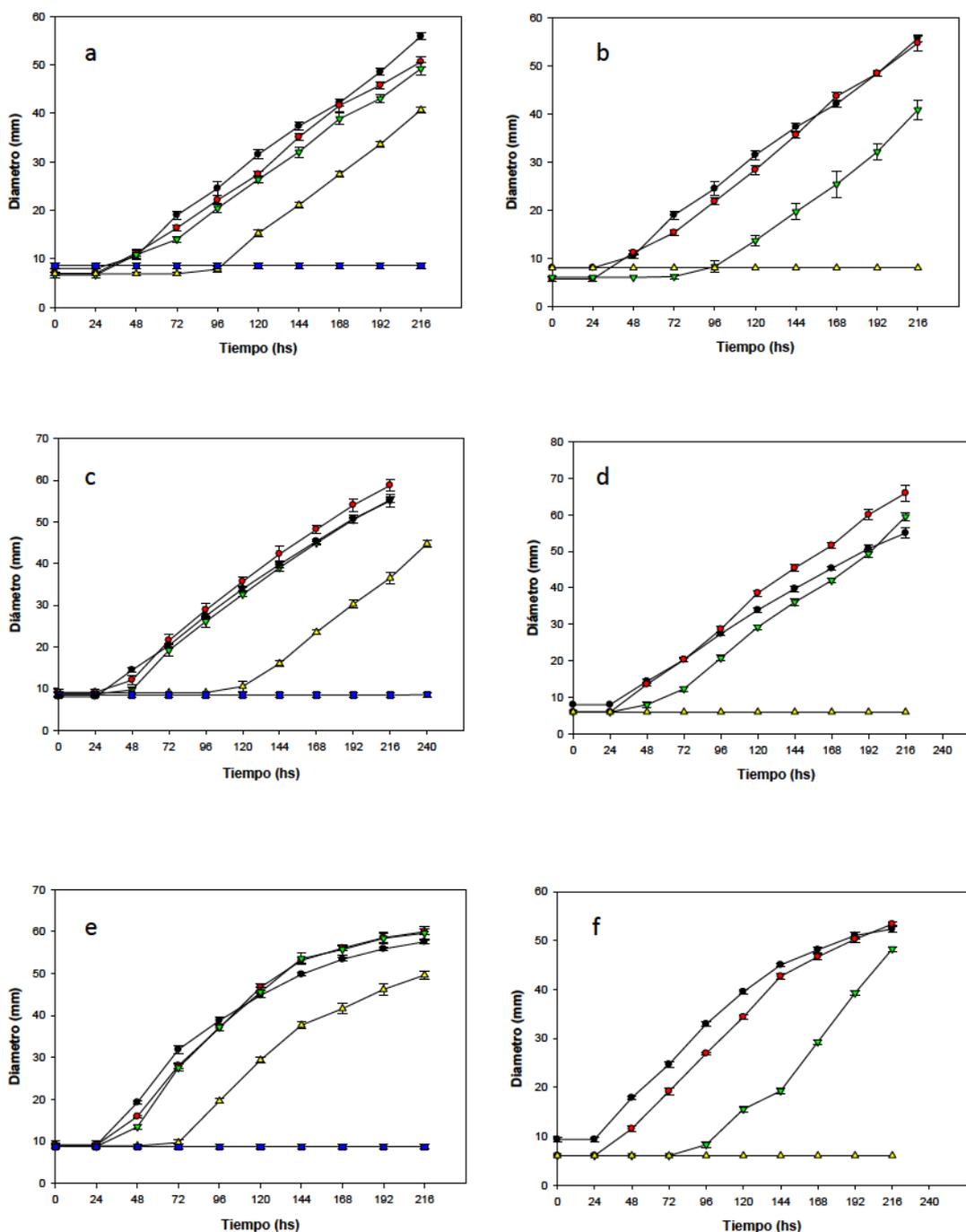


Figura 4.2.13 Curva de crecimiento de *F. graminearum* Fg44 (a y b); Fg36 (c y d); Fg48 (e y f) en medio sólido MEA adicionado con: (a,c,e) ●sin ácidos orgánicos; ●7,79 mM; ▼10,06 mM; ▲15,71 mM; ■19,84 mM de ácido acético; (b,d,f) ●sin ácidos orgánicos; ●33,21 mM; ▼56,29 mM; ▲88,91 mM de ácido láctico.

En la Tabla 4.2.11 se observan las fases de latencia de *F. graminearum* desafiados a distintas concentraciones de ácido láctico y acético. Se encontró que 8,56 mM de ácido acético no disociado (CFM) en el medio de cultivo fue suficiente para inhibir el crecimiento de las cepas de *F. graminearum* estudiadas. Además empleando el método descrito en los Materiales y Métodos se encontró que dicha concentración de ácido acético tuvo acción fungicida sobre las tres cepas ensayadas.

Por otra parte, se obtuvo que la mínima concentración de ácido láctico no disociado que inhibió a las tres cepas de *F. graminearum* fue 49,55 mM ejerciendo un efecto fungicida. En las concentraciones de ácidos no fungicidas, se observó que la fase de latencia aumentó cuando aumentaba la concentración de ácido en el medio.

Tabla 4.2.11 Determinación de la CFM de los ácidos láctico y acético sobre *F.*

graminearum

Parte A: Ácido acético

Ácido acético calculado (mM)	Ácido acético medido por HPLC (mM)	pH final medio cultivo	Ácido acético no disociado (mM)	Fase Lag (h)		
				<i>F. graminearum</i> Fg44	<i>F. graminearum</i> Fg36	<i>F. graminearum</i> Fg48
-	ND	6,75	-	26 ± 0,99	22,2 ± 1,21	20,97 ± 1,34
6,93	7,79	5,51	1,15	29,13 ± 2,1	30,7 ± 1,69	25,05 ± 2,01
10,39	10,06	5,18	2,73	31,53 ± 1,56	49,92 ± 2,24	27,37 ± 1,67
13,86	15,71	4,98	5,82	91,22 ± 3,77	130,07 ± 5,11	69,29 ± 4,12
17,32	19,84	4,87	8,56*	>720	>720	>720
20,78	25,47	4,70	13,47*	>720	>720	>720

Parte B: Ácido láctico

Ácido láctico calculado (mM)	Ácido láctico medido por HPLC (mM)	pH final medio cultivo	Ácido láctico no disociado (mM)	Fase Lag (h)		
				<i>F. graminearum</i> Fg44	<i>F. graminearum</i> Fg36	<i>F. graminearum</i> Fg48
-	ND	6,75	-	26 ± 0,99	22,2 ± 1,21	20,97 ± 1,34
27,10	33,21	4,45	5,96	29,68 ± 1,89	23,58 ± 1,33	26,1 ± 2,26
54,19	56,29	3,91	24,28	91,1 ± 3,59	46,41 ± 1,63	92,36 ± 3,57
81,29	88,91	3,69	49,55*	>720	>720	>720
108,38	122,33	3,47	84,56*	>720	>720	>720

Una suspensión de 5×10^5 conidios/ml fue inoculada en el centro de las placas con medio MEA con diferentes concentraciones de ácidos láctico y acético puros. Se realizaron curvas de crecimiento y regresiones lineales. A través de las regresiones, se calcularon las fases de latencia. *Concentraciones de ácido láctico o acético no disociado con actividad fungicida. Los ácidos orgánicos se agregaron al medio de cultivo y se corroboró la concentración mediante HPLC.

Una vez determinada la CFM de los ácidos individuales, se estudió el efecto de las mezclas de estos ácidos sobre *F. graminearum*, ya que en los SLC PSFG se encuentran mezclados.

A su vez se quiso estudiar si al combinar dichos ácidos se reducía la concentración necesaria de ambos usados individualmente para inhibir a *F. graminearum*. Se realizaron mezclas de ácidos entre 0,06; 0,12; 0,25; 0,50 veces la CFM de cada ácido para estudiar el efecto combinado de ambos ácidos.

En la Figura 4.2.14 se muestran el índice III_{KD} (a) y la relación LagT/LagC (b) de las tres cepas de *F. graminearum* en función de la concentración de ácidos no disociados totales en los medios de cultivo (Tabla 4.2.10).

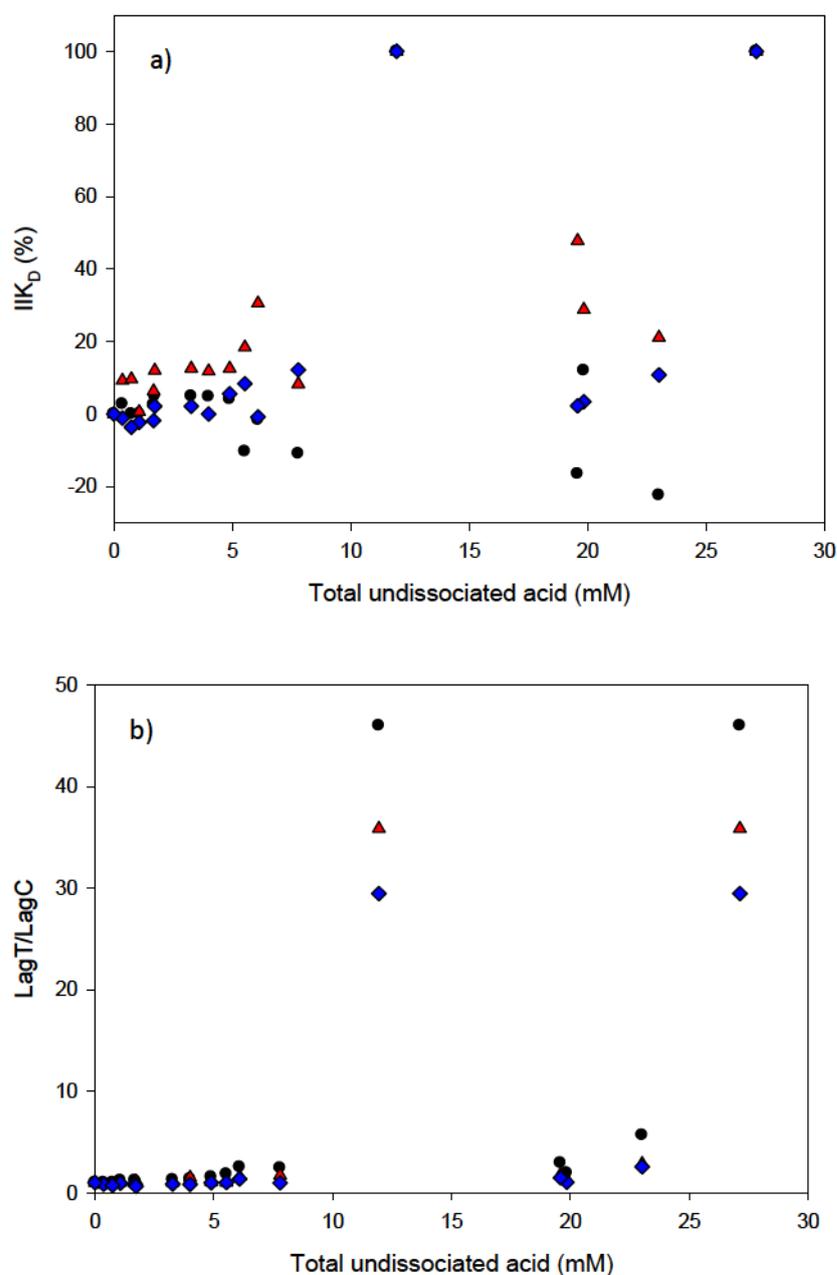


Figura 4.2.14. Parámetros de crecimiento de *F. graminearum* en función de la concentración de ácido láctico y acético no disociados presentes en diferentes mezclas de ácidos láctico y acético en medio sólido. a) IIK_D y b) relación LagT/LagC de (●) *F. graminearum* Fg44; (▲) Fg48 y (◆) Fg36. Los ácidos láctico y acético fueron adicionados al medio sólido fundido y luego se plaquearon como se indican en los Materiales y Métodos.

De forma similar a lo observado en los ensayos de inhibición en placa con SLC PSFG, en los ensayos de inhibición con mezclas de ácido láctico y acético observamos que la fase de latencia fue el parámetro fúngico más afectado, la mayor fase de latencia

observada se encontró con mayor concentración de ácidos (9,92 mM AA: 22,23 mM AL y 4,96 mM AA: 44,46 mM AL, con 11,94 mM y 27,12 mM de ácidos no disociados totales). Los demás tratamientos tuvieron fase de latencia entre $15,68 \pm 0,98$ y $88,71 \pm 5,27$ h. La velocidad de crecimiento fue 0 en los dos tratamientos mencionados arriba, mientras que los demás estuvieron entre $0,32 \pm 0,03$ y $0,44 \pm 0,02$ mm/h. También, se observó que 5 de los 16 tratamientos produjeron una mayor velocidad de crecimiento que los controles. En resumen, se estableció que la menor mezcla capaz de inhibir el desarrollo de *F. graminearum* fue de 6,62 mM y 5,32 mM de ácido acético y láctico no disociado (corresponde a la mezcla con 9,92 mM AA: 22,23 mM AL), respectivamente.

El sinergismo producido por la mezcla de ácidos fue expresado matemáticamente mediante el Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (Índice CIF), el cual fue calculado como la suma de los índices FIC de cada ácido. Si la suma entre ambos ácidos es igual a 1, el efecto de los ácidos es aditivo; si la suma es menor a 1, el efecto de los ácidos es sinérgico y si la suma es mayor a 1, los analitos tienen un efecto antagonico entre ellos. En nuestro caso, encontramos que el índice CIF de la mezclas de ácidos fue 0,75, es decir que la mezcla de estos ácidos tuvo un efecto sinérgico en la inhibición de *F. graminearum*.

Es decir, se necesitan 2 veces menos de ácido acético y 2,23 veces menos de ácido láctico en la mezcla que en la CFM individual. En las tres mezclas de ácidos no fungicidas (1,19 mM AA – 44,46 mM; 2,38 mM AA – 44,46 mM; 4,96 mM AA – 44,46 mM), la sumatoria de ácidos no disociados es mayor a la observada en la mezcla de ácidos con actividad fungicida (9,92 mM AA – 22,23 mM AL). Esto se debe a que el principal ácido en la mezcla es el ácido láctico, el cual posee una CFM individual 4,69 veces más alto el ácido acético.

Si comparamos estos datos con los encontrados con los SLC PSFG, donde se necesitó 17,55 mM y 21,55 mM de ácido láctico y acético no disociado, respectivamente, para producir el efecto fungicida, observamos que se necesitó 3,29 veces más ácido láctico y 3,25 veces más ácido acético no disociado en los SLC PSFG para producir un efecto fungicida sobre *F. graminearum*. Esto puede deberse a que se está comparando el efecto fungicida en dos condiciones diferentes, en una de ellas los hongos sometidos a los

ácidos están en presencia de los metabolitos producidos por los microorganismos del kefir, y en la otra estos metabolitos están ausentes.

4.2.8 Efecto de los SLC PSFG sobre la producción de zearalenona de *F. graminearum*

Como se indicó anteriormente, una de las toxinas producidas por *F. graminearum* es la zearalenona (ZEA). Teniendo en cuenta los resultados anteriores donde se demostró la actividad antifúngica de los SLC PSFG, se decidió estudiar el efecto de los mismos sobre la producción de ZEA. Para ello se empleó un kit comercial Veratox[®] y la metodología indicada en materiales y métodos.

En la Figura 4.2.15 se muestran los resultados obtenidos en dos ensayos independientes (a y b). Se encontró que en todos los tratamientos probados, excepto el tratamiento MEA-SLC PSFG pH 3,5 - 70% v/v (que correspondió al único medio que tuvo efecto fungicida) no se detectó producción de la toxina. Con respecto a los dos controles ensayados, observamos que la producción de ZEA fue mayor en medio MEA con el agregado de PS, en las tres cepas. Esto sugiere que el PS estimula la producción de ZEA. La mayor producción de toxina en un medio sin SLC PSFG se observó en el medio MEA con agregado de PS acidificado con HCl hasta pH 3,5, la cual fue de $40,99 \pm 4,61$ ppb (4.2.15a) y $52,42 \pm 4,72$ ppb (4.2.15b), para la cepa *F. graminearum* Fg44, en ausencia de ácidos orgánicos provenientes del metabolismo microbiano del kefir. Cuando se suplementa el medio de cultivo con SLC PSFG se observa que a una concentración de ácidos no disociados totales de 39,10 mM no hay producción de ZEA, esta concentración corresponde a SLC PSFG con actividad fungicida.

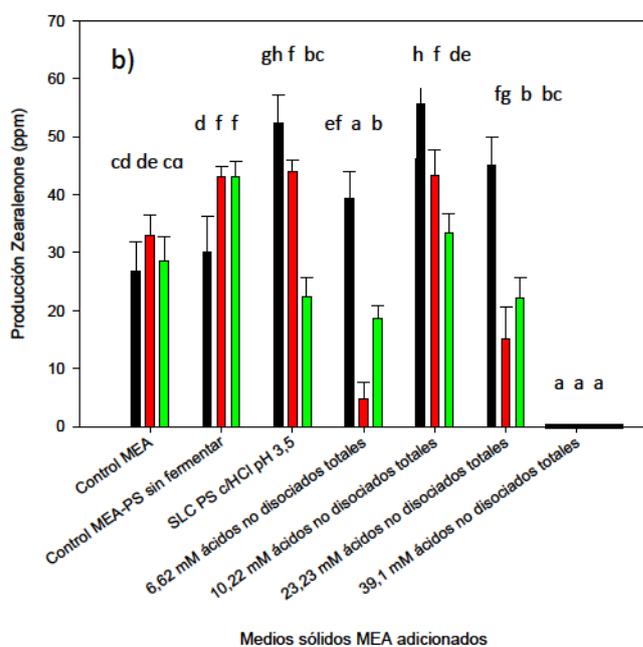
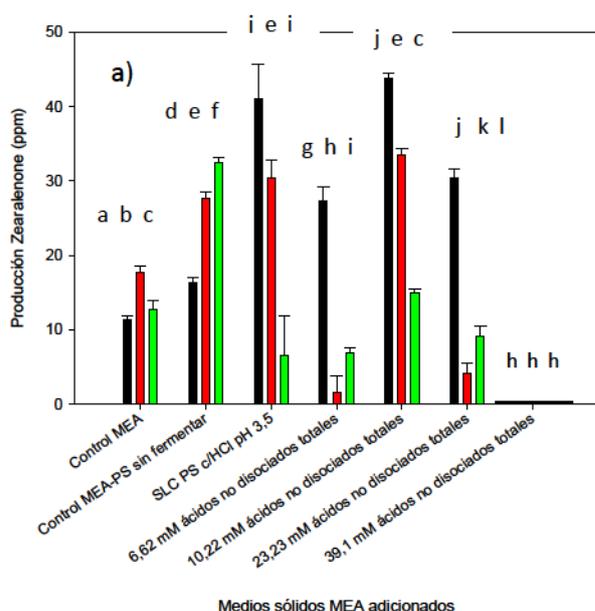


Fig. 4.2.15 Efecto de los SLC PSFG, obtenidos por la fermentación del permeado de suero con gránulos de kefir CIDCA AGK1, a 30°C sobre la producción de zearalenona en medio sólido MEA: (■) *F. graminearum* Fg44; (■) *F. graminearum* Fg36; (■) *F. graminearum* Fg48. Se realizaron dos ensayos independientes (a y b). Barras con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$). 6,62 mM (corresponde al medio con 25% SLC PSFG a pH 3,5); 10,22 mM (corresponde al medio con 70% SLC PSFG a pH 4,0); 23,23 mM (corresponde al medio con 50% SLC PSFG a pH 3,5) y 39,10 mM de ácidos totales no disociados (corresponde al medio con 70% SLC PSFG a pH 3,5).

A menores concentraciones de SLC PSFG se observaron dos comportamientos diferentes con las cepas evaluadas. Se observó que la producción de toxina aumentó a medida que aumenta la concentración de ácidos láctico y acético no disociado, para la cepa *F. graminearum* Fg44. Para la cepa de *F. graminearum* Fg48, la producción de ZEA disminuyó con todas las concentraciones de ácidos no disociados mientras que para la cepa Fg36 disminuyó en todos los casos, excepto para una concentración de 70% v/v de SLC PSFG a pH 4,0 (10,22 mM de ácidos no disociados totales). Esto sugiere que la producción de la micotoxina fue de carácter cepa-dependiente. Son necesarias más investigaciones para continuar estudiando estos comportamientos de *F. graminearum* frente a los SLC PSFG.

La actividad antifúngica de las BAL produce a variedad de compuestos antimicrobianos, por ejemplo, productos de fermentación que reducen el pH como ácido láctico y acético, así como peróxido de hidrogeno, ácido fórmico, ácido propiónico y diacetilo (Lindgren y Dobrogosz, 1990). El mecanismo preciso de acción antimicrobiana es difícil de elucidar debido a la complejidad y las comunes interacciones sinérgicas entre diferentes compuestos (Corsetti y col., 1998; Niku-Paavola y col., 1999).

En la leche fermentada de kefir se menciona la presencia, en general, de ácido láctico, etanol, dióxido de carbono, vitaminas del complejo B y compuestos aromáticos como diacetilo y acetaldheído (Toba, 1987). Garrote y col. (2000) evaluaron la presencia de ácidos orgánicos en leche descremada estéril y caldo MRS (De Man y col. 1960) fermentados con gránulos de kefir CIDCA AGK1 y detectaron 299,41 mM y 289,93 mM de ácido láctico, respectivamente; y 17,32 mM y 107,38 mM de ácido acético, respectivamente. Esta alta concentración de ácido acético en el caldo MRS se debe al contenido de acetato de sodio como constituyente del medio de cultivo (5 g/l). Estos autores también encontraron que la mezcla de ácidos tuvo efecto bacteriostático sobre *E. coli* 3. En nuestro caso, la mayor producción de ácidos láctico y acético se observó en los SLC PSFG a pH 3,5, donde hubo 169,35 mM y 50,22 mM de ácido láctico y acético, respectivamente. Cuando este SLC (al 70%) se agarizó produjo la muerte fúngica de las tres cepas de *Fusarium graminearum* estudiadas (Figura 4.2.7 a y b). Es decir, esa es la menor concentración de SLC que se necesitó para producir la inhibición

completa del crecimiento de los hongos estudiados (CFM). Debemos destacar que estos resultados se obtienen con los gránulos de kefir CIDCA AGK1 crecidos en PS resuspendido al 5% p/v, un efluente de la industria láctea cuyo principal componente es la lactosa (3,32 – 3,54%) y que tiene escasa concentración de fuentes de nitrógeno en su composición (0,002-0,01% nitrógeno total). Y esto sugiere que los gránulos de kefir CIDCA AGK1 tienen una gran capacidad de crecimiento en un medio de desecho económico, y tienen un potencial como bioconservante.

Estos resultados son muy prometedores comparados con los ensayos que realizamos previamente en nuestro laboratorio con sobrenadantes libres de células de leches fermentadas con gránulos CIDCA AGK1 a distintos pH, siendo el más bajo e inhibidor a pH 3,3 frente a *A. flavus* AFUNL5, donde solo se observó un incremento significativo de la fase de latencia. Encontrándose en los SLC de leche 268,27 mM de ácido láctico y 17,66 mM de ácido acético (León, 2013), los cuales no fueron capaces de producir una inhibición completa del crecimiento fúngico. Estos resultados sugieren que en los SLC de leche se ponen en juego dos efectos antagónicos, uno inhibidor debido a la presencia de los ácidos orgánicos y otro estimulante debido a la presencia de componentes de la leche que permanecen en los SLC, a pesar de su filtración. Entonces, los SLC PSFG, al tener menos nutrientes en su composición que la leche, tuvieron mayor poder inhibidor que los obtenidos en leche, en detrimento del efecto estimulante, predominantes en los sobrenadantes de leche.

Además, observamos que en el medio agarizado con SLC PSFG al 70% v/v de pH 3,5 había 17,55 mM y 21,55 mM de ácido láctico y acético no dissociado. Estas concentraciones fueron 3,99 y 1,52 veces inferiores que las determinadas en los SLC PSFG a pH 3,5 al 70% v/v en el ensayo de inhibición de la germinación. En éste había 70,07 mM y 32,67 mM de ácido láctico y acético no dissociado. Esto se debió a que el pH del medio líquido fue de 3,63, mientras que el del medio agarizado fue 4,55. Estas diferencias de pH se debió a que los SLC se diluyen con PS sin fermentar, en el ensayo de inhibición de la germinación, mientras que los SLC se agregaron al medio MEA en el ensayo de inhibición en placa, lo cual modificó el pH en mayor medida. Esto sugiere que los hongos desarrollan algún mecanismo para protegerse en las condiciones más estresantes, en este caso, la presencia de SLC PSFG con ausencia de agar MEA (ensayo de inhibición de la germinación). Estos mecanismos no estarían activos en el medio

sólido con SLC PSFG, debido a que la composición del agar MEA, ejercería alguna protección.

Comparando los resultados obtenidos mediante el ensayo de reducción de la germinación y inhibición en placa con SLC PSFG sobre *F. graminearum* observamos que, si bien cada uno de ellos tiene sus ventajas y desventajas como se muestran en la Tabla 4.2.6, se necesitó una concentración muy similar de ácidos no disociados totales (alrededor de 39 mM) para producir la muerte de los hongos estudiados.

Cuando trabajamos con ácidos acético y láctico puro y sus mezclas observamos que en el ensayo de reducción de la germinación arrojó que habían dos mezclas de ácidos con capacidad fungicida y efecto sinérgico (una con 4,96 mM: 44,46 ácido acético: ácido láctico y la otra con 9,92 mM: 22,23 ácido acético: ácido láctico). Sin embargo, en el ensayo de inhibición en placa, solo la segunda mezcla con mayor proporción de ácido acético fue fungicida. Los resultados obtenidos mediante el segundo método están más acordes a los obtenidos por investigadores como León y col., 2012, quienes asignan al ácido acético como el agente clave para la inhibición de *A. flavus* con mezclas de ácidos láctico y acético.

Se estudió el efecto de los ácidos orgánicos láctico y acético de forma individual sobre *F. graminearum* encontrando que la CFM, es decir, la mínima concentración de ácido capaz de inhibir el crecimiento fúngico por 30 días, fue de 19,84 mM para ácido acético (equivalente a 8,56 mM ácido no disociado), para las 3 cepas de *F. graminearum* evaluadas, mientras que se necesitó 88,91 mM de ácido láctico (equivalente a 49,55 mM ácido no disociado) para producir la inhibición total de *F. graminearum*. Estos resultados tienen relación con los obtenidos por Stiles y col. (2002) quien determinó que el acetato de sodio, presente en el caldo MRS en una proporción 5 g/l, afecta el crecimiento de 33 cepas de 42 evaluadas pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Rhizopus*. En ese estudio, 13 de las 14 cepas de *Fusarium* fueron afectadas por la presencia del acetato en el medio de cultivo, y 6 de ellas fueron completamente inhibidas.

Encontramos que a concentraciones menores a la CFM de los ácidos, y a medida se aumenta la concentración de ácido en el medio de cultivo se alarga la fase Lag y aumenta la velocidad de crecimiento K_D (mm/h) con relación al control, indicando que estas concentraciones subletales de ácidos, favorecen su crecimiento, a pesar de la

extensión de la fase de latencia, nuestros resultados coinciden parcialmente con los obtenidos por Molina y Giannuzzi (1999) y Leon y col. (2012) donde el agregado de ácido en el medio de cultivo prolonga la fase Lag y reducen la K_D de los hongos evaluados.

Hay estudios previos que reportan efectos sinérgicos entre los ácidos orgánicos láctico y acético (Rubin, 1978; Adams y Hall 1988; Dickson y Maynard 1992; León y col., 2012). Mezclas con ácido láctico, ácido cítrico y sorbato de potasio mostraron efectos sinérgicos produciendo una reducción del crecimiento o una inhibición total del crecimiento de diversos patógenos (Restaino y col., 1981; Restaino y col., 1982). Moon (1983) encontró que mezclas de ácido láctico, ácido acético y ácido propiónico inhiben levaduras que normalmente crecen con altas concentraciones (100 mM) de los ácidos individuales.

En nuestro ensayo, se observó un efecto inhibitor sinérgico entre ácido láctico y acético (FIC= 0,75) sobre *F. graminearum* ensayados. Resultados similares fue encontrados por León *et al.* 2012 frente a *A. flavus*.

La CFM encontrada de las mezcla de ácidos corresponde a 50% de la CFM individual del ácido acético y 25% de la CFM del ácido láctico, lo que indica que el ácido acético es el principal responsable de la actividad antifúngica y que el ácido láctico tiene como función principal bajar el pH del medio de cultivo, de manera que éste se acerque al pK_a del ácido acético, ya que el pK_a del ácido acético es 4,75 y el pH de la mezcla es de 4,33. León y col. (2012), también atribuye la actividad antifúngica de la mezclas a la presencia del ácido acético, ya que la mezcla está constituida por una concentración de ácido acético que representa el 75% de ácido en relación a la CFM del ácido acético determinado, y 21,81% de ácido láctico respecto de la CFM del ácido láctico individual. En la mezcla de ácidos orgánicos con capacidad fungicida obtenida en este trabajo (9,92 mM AA; 22,23 mM AL), el 60,63% del ácido acético está en su forma no disociada lo que le permitiría entrar a la célula fúngica, mientras que sólo el 39,37% del ácido láctico está en su forma no disociada, corroborando la función del ácido láctico como reductor de pH. El ácido láctico, acético y propiónico interactúan de forma similar con las membranas celulares neutralizando el gradiente electroquímico de protones, pero el efecto del ácido acético y propiónico depende, con frecuencia, del la reducción del pH causada por el ácido láctico (Freese y col., 1973; Eklund, 1980).

Los métodos analíticos utilizados para la determinación de zearalenona incluyen cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Krska y Josephs 2001; De Saeger y col., 2003; Nuryono y col., 2005) y los métodos rápidos, como inmunoensayos enzimáticos (ELISA) (Krska y Josephs 2001; Nuryono y col., 2005; Zheng y col., 2006). Métodos de ELISA se han convertido en una de las herramientas más útiles para el seguimiento rápido de las micotoxinas, en especial para el cribado de las materias primas. Según Krska y Josephs (2001), el estudio de intercomparación demostró que los métodos ELISA se reconocen como una herramienta de análisis muy precisos en la detección ZEA. A través del ensayo inmunológico determinamos que la presencia del permeado de suero sin fermentar produjo un aumento de la producción de toxina para las tres cepas probadas. Gwiazdowska y col. (2008) mostraron que los SLC de dos propionibacteria, conteniendo ácido propiónico y acético, reducen significativamente el crecimiento y la producción de ZEA en medio líquido de *F. culmorum*. En forma similar, en nuestro estudio, el medio MEA con 70% v/v de SLC PSFG a pH 3,5 tuvo un efecto fungicida sobre *F. graminearum* y no se detectó producción de ZEA.

4.2.9 Conclusiones

Los SLC PSFG de $\text{pH} \leq 4$, se obtuvieron los mayores porcentajes de reducciones de la germinación. Y se demostró que el SLC PSFG a pH 3,5 tuvo capacidad fungicida sobre las cepas de *F. graminearum* evaluadas en medio sólido. La aplicación de SLC en proporciones que no causan la muerte fúngica generó producción de ZEA, en una de las cepas. Por esto, la posible aplicación como bioconsecante requiere futuros estudios para profundizar el análisis del efecto del kefir sobre los hongos y sus toxinas; así también, resultaría conveniente aplicar el estudio a diversos géneros fúngicos productores de micotoxinas.

4.3 Estudio de la capacidad inhibitoria del permeado de suero fermentado con gránulos de kefir sobre *A. parasiticus* CMUNLP7.

La mayoría de los productos agrícolas son susceptibles de contaminación por hongos durante algunas de las etapas de producción, procesamiento, transporte o almacenamiento. (Vaamonde, 1996). *Aspergillus* y *Penicillium* se encuentran generalmente como contaminantes en alimentos durante el secado y almacenamiento, mientras que las especies de *Fusarium* pueden producir micotoxinas antes o después de la cosecha (CAST, 2003).

Dentro de las familias más importantes de micotoxinas se encuentran las aflatoxinas, los tricotecenos, la ocratoxina A, las fumonisinas y la zearalenona. Las condiciones de colonización de los sustratos por los hongos micotoxigénicos, así como su posterior contaminación con micotoxinas juegan un papel fundamental en las estrategias de vigilancia y control de la industria alimentaria.

Los mohos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticios. Los productos metabólicos de su desarrollo suelen ser muy tóxicos, tanto para el hombre como para otros animales. También inhiben la germinación del grano y causan cambios de color, aumento de la temperatura, enmohecimiento, apelmazado y finalmente podredumbre de las semillas. Algunas especies como *A. niger* o *A. oryzae*, son de interés industrial y se emplean en la fermentación de alimentos (Kozakiewicz, 1989).

Químicamente, las aflatoxinas corresponden a derivados del grupo de difuranocumarina que muestran fluorescencia bajo la luz ultravioleta. De acuerdo al color de la fluorescencia las aflatoxinas son agrupadas en aflatoxina B₁ y B₂ (AFB₁, AFB₂) y G₁ y G₂ (AFG₁, AFG₂). La AFB₁ es la más tóxica y presenta mayor prevalencia (Busby, 1984). Las aflatoxinas pueden ser producidas por cuatro especies de *Aspergillus* como son *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* y *A. pseudotamarii* (Pitt, 2000; CAST, 2003).

La contaminación de los alimentos con estos hongos y aflatoxinas ha sido detectada más frecuentemente en África y sur este de Asia. Los alimentos más frecuentemente contaminados con aflatoxinas son maíz y productos del maíz, maní, frutas secas y productos lácteos (éstos con AFM₁) (IARC, 1993). En el caso de las aflatoxinas, a sus

efectos hepatotóxicos y hepatocancerígenos se añaden el efecto inmunodepresor, aumentando la susceptibilidad a enfermedades de origen viral y bacteriano (Richard y col., 2003; Presello y Botta, 2004). Existe evidencia epidemiológica que indica que las aflatoxinas son productoras de enfermedad humana en diversas regiones del mundo. Al respecto, los estudios epidemiológicos en África y Asia Oriental han demostrado una correlación positiva entre el logaritmo de ingestión de alimentos contaminados con aflatoxina B₁ y la ocurrencia de cáncer primario de hígado en humanos (Álvarez y col., 2000).

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del kefir y sus derivados sobre el crecimiento y producción de aflatoxina B₁ por *Aspergillus parasiticus* como base para realizar un biopreservante.

4.3.1 Determinación de la capacidad inhibitoria de los SLC PSFG sobre *A. parasiticus* CMUNLP7

Para realizar estos estudios se utilizó el método de inhibición en placa empleando diferentes concentraciones de SLC PSFG. Debido a que en el capítulo anterior solo se observó actividad fungicida de los SLC PSFG a pH 3,5 contra *F. graminearum*, se comenzó a trabajar con ese SLC PSFG y diluciones del mismo.

Se realizó un primer ensayo en placa con las concentraciones más altas posibles de SLC PSFG a pH 3,5 en el agar, estas fueron al 75% y 70% v/v. Se encontró que estas concentraciones tuvieron capacidad fungicida sobre *A. parasiticus* CMUNLP7 (datos no mostrados).

Por lo cual se decidió llevar a cabo otro ensayo para evaluar la inhibición producida por un rango de concentraciones descendientes, las cuales fueron: 65; 62,5; 60; 55, 50 y 25% v/v de SLC PSFG. El medio MEA fundido se mezcló con el SLC PSFG para obtener las diferentes concentraciones finales de trabajo y se determinó el pH final del medio de cultivo (Materiales y Métodos). Para este experimento se utilizaron los siguientes controles:

- Medio MEA sin agregado de SLC.
- Medio MEA adicionado con PS estéril sin fermentar.

- Medio MEA adicionado con PS acidificado con HCl 3M al mismo pH que el SLC del PSFG (pH= 3,5).
- Medio MEA adicionado con PS acidificado con Ácidos Orgánicos en las mismas concentraciones determinadas para los SLC de PSFG (Láctico 154,14 mM y Acético 41,51 mM). El PS acidificado artificialmente se adicionó al medio en las mismas concentraciones que se usaron en los tratamientos con mayor concentración de PSFG.

Las soluciones controles acidificadas artificialmente se prepararon a partir de PS sin fermentar. El PS se esterilizó y luego se acidificó con HCl hasta alcanzar el mismo pH del SLC PSFG empleado. El mismo procedimiento se realizó para los controles acidificados con ácidos orgánicos puros, cuyas concentraciones se seleccionaron a partir de aquellas presentes en los SLC PSFG (Láctico 154,14 mM y Acético 41,51 mM).

La evaluación de diferentes controles en este experimento obedeció a la necesidad de determinar el efecto producido por el PSFG en sí mismo y sin fermentar, y si el efecto inhibitorio del PS fermentado podría deberse sólo a la presencia de los ácidos orgánicos, o a la combinación de éstos con el descenso de pH y/o a la presencia de otros productos de la fermentación, tal como se describirá a continuación. El control de MEA acidificado con HCl 3M se utilizó para evaluar si la acidificación con ácidos fuertes, o sea, el descenso exclusivo del pH sin presencia de ácidos orgánicos débiles, podía tener el mismo efecto antifúngico que el PSFG. La mezcla de los ácidos orgánicos puros buscó confirmar si la sola presencia de éstos era responsable de la inhibición fúngica. El control de PS sin fermentar se utilizó para establecer la diferencia entre la inhibición cuando hay o no metabolitos presentes producidos por la fermentación. Y el control de medio MEA solo se utilizó para evaluar el crecimiento del hongo sin ningún tipo de estrés.

Una vez obtenidos el PSFG se determinó la concentración real de ácidos orgánicos presentes en cada uno por HPLC. Estos resultados se presentan en la Tabla 4.3.1.

Tabla 4.3.1. Concentración de Ácido láctico y Acético en SLC PSFG y PS acidificados artificialmente.

	pH	Ácido láctico (mM)	Ácido láctico sin disociar (mM)	Ácido acético (mM)	Ácido acético sin disociar (mM)
PS c/ácidos orgánicos	3,48	161,53	108,43	44,26	42,00
PS c/HCl	3,50	nd		nd	
SLC PSFG (1er ensayo)	3,49	142,69	95,05	46,28	43,87
SLC PSFG (2do ensayo)	3,51	154,14	101,09	41,51	39,25

PS fue fermentado con gránulos de kefir CIDCA AGK1 al 10% a 30 °C hasta alcanzar el pH 3,5. Se obtuvieron los SLC a partir de estos como se indicó en los materiales y métodos. Las concentraciones de ácido láctico y acético se determinaron mediante HPLC. Nd: no detectado.

Una vez obtenidos los sobrenadantes libres de células de PSFG y cuantificados sus ácidos orgánicos, se procedió a hacer los experimentos de inhibición fúngica mediante los ensayos de inhibición en placa, en los cuales se determinó el crecimiento del hongo en milímetros durante un periodo de tiempo hasta invadir el total de la caja de Petri. Los gráficos de crecimiento (mm) vs. Tiempo (h) se presentan en la Figura 4.3.1

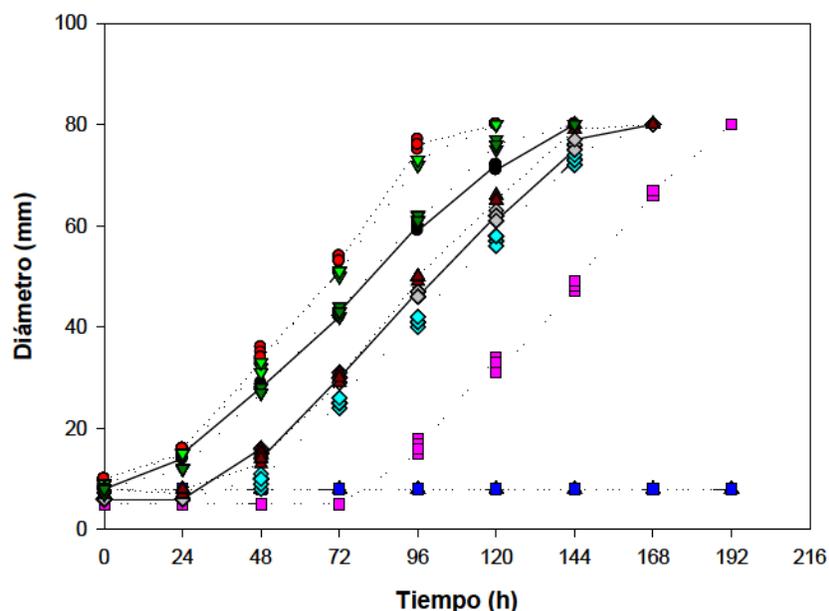


Figura 4.3.1 Curva de crecimiento de *A. parasiticus* CMUNLP7 (mm/h) desarrollado en el medio con diferentes tratamientos. ●: MEA sin suplementar, ●: MEA+PS sin fermentar, ▼: MEA+PS acidificado con HCl, ■ MEA+SLC de PSFG adicionado al 65% v/v, ■ MEA + SLC de PSFG 62,5%; ◆: MEA + SLC de PSFG 60%; ◆: MEA+SLC de PSFG 55%; ▲: MEA+SLC de PSFG adicionado al 50% v/v, ▼: MEA+SLC de PSFG adicionado al 25%. Todos los valores corresponden a cuatro mediciones diarias de tres experimentos independientes.

Las curvas graficadas indican el crecimiento del hongo en milímetros durante el tiempo de incubación, hasta alcanzar el diámetro máximo de la caja de 80 mm. Los tratamientos fueron PSFG adicionado a diferentes concentraciones en el medio MEA: 25%, 50%, 55%, 60%, 62,5% y 65% v/v y los controles fueron los descriptos arriba. En el tratamiento con agregado de PSFG al 65% v/v no se observó crecimiento fúngico, por lo tanto su curva fue plana. Los controles de MEA con PS acidificado con HCl 3M y MEA+PS sin fermentar, fueron los primeros en alcanzar el extremo de la caja de Petri, en 120 horas, indicando que tuvieron una mayor tasa de crecimiento con respecto al control de MEA sin suplementar, el cual tardó 144 horas. Esto pudo deberse a que la presencia de PS aumentó la disponibilidad de nutrientes para el hongo y por lo tanto su velocidad de crecimiento. La acidificación con un ácido fuerte solo no produjo, al parecer, ningún efecto contrario al aporte que hizo el PS adicionado, indicando que la sola acidificación no tuvo efecto antifúngico. El hongo

sometido a concentraciones del 25% y 50% v/v PSFG alcanzó el borde de la caja en el mismo tiempo que requirió el control de MEA sin suplementar, lo cual estaría indicando que las concentraciones bajas de SLC PSFG no aportan suficientes metabolitos, como para producir un efecto inhibitorio.

Cabe resaltar que gráficamente se observó que con una concentración de 50% v/v de SLC PSFG el hongo tardó más tiempo en superar el diámetro inicial de crecimiento que en cualquiera de los controles o con 25% v/v de PSFG. No obstante, alcanzó el borde de la caja en el mismo tiempo, pues se observó que la pendiente de crecimiento fue más pronunciada que las dos anteriores tal como se observará más adelante. Con concentraciones de 55%, 60% y 62,5 % v/v de PSFG continuó retrasándose el comienzo del crecimiento fúngico, respecto a todos los controles. Además, en estas concentraciones el hongo tardó entre 168 - 192 horas en alcanzar el diámetro máximo de la caja de Petri, más que todos los tratamientos anteriores, lo cual nos está indicando que éste producto, en concentraciones altas, hace más dificultoso el crecimiento del hongo, aumentando su fase de latencia.

El PSFG en concentraciones 65% inhibió totalmente el crecimiento fúngico.

4.3.2 Determinación del efecto fungicida del PSFG.

De igual forma que se trabajó con *F. graminearum*, se repitió el ensayo para determinar la capacidad fungicida de los SLC PSFG. Para ello, se sembraron placas de medio MEA suplementado o no con SLC PSFG de pH 3,5 al 65% y se incubaron a 30°C durante 7, 15 y 30 días y no se observó crecimiento en coincidencia con los datos ya comentados. Transcurrido ese tiempo, se tomaron muestras del centro de las placas (lugar donde se depositaron los conidios) según se detalló en materiales y métodos y se depositaron en placa con medio MEA sin suplementar y se incubaron durante 30 días. No se observó crecimiento fúngico corroborando que la actividad de los SLC fue fungicida.

Para corroborar si la concentración de 65% v/v de PSFG era fungicida, se repitió el ensayo con dichos SLC PSFG. Para ello, se sembraron placas de medio MEA suplementado o no

con SLC PSFG de pH 3,5 al 65% y se incubaron a 30°C durante 7, 15 y 30 días y no se observó crecimiento en coincidencia con los datos ya mostrados (Figura 4.3.1). Transcurrido ese tiempo, se tomaron muestras del centro de las placas (lugar donde se depositaron los conidios) según se detalló en materiales y métodos y se depositaron en placa con medio MEA sin suplementar y se incubaron durante 30 días. No se observó crecimiento fúngico corroborando que la actividad de los SLC fue fungicida.

4.3.3 Cálculo de parámetros cinéticos.

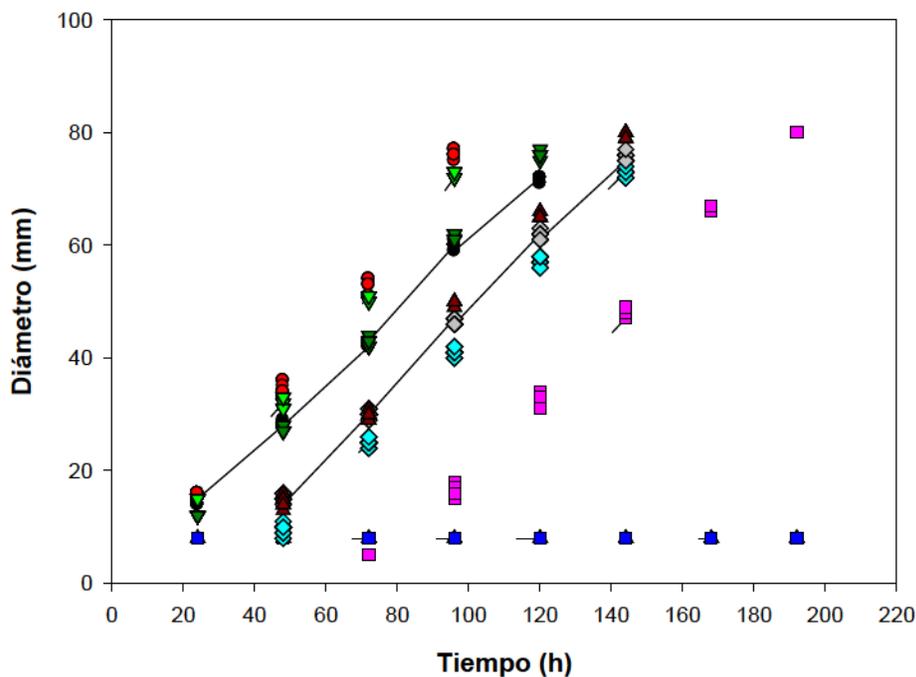


Figura 4.3.2. Regresión lineal del crecimiento de *A. parasiticus* CMUNLP7 en presencia de de medios de cultivo con o sin PSFG. ●: MEA sin suplementar, ●: MEA+PS sin fermentar, ▼ MEA+PS acidificado con HCl, ▲: MEA+PS acidificado con Ácidos Orgánicos (adicionado al medio al 65% v/v), ■: MEA+SLC de PSFG adicionado al 65% v/v, ■: MEA + SLC de PSFG 62,5%; ◆: MEA + SLC de PSFG 60%; ◆: MEA+SLC de PSFG 55%; ▲: MEA+SLC de PSFG adicionado al 50% v/v, ▼: MEA+SLC de PSFG adicionado al 25%. Todos los valores corresponden a cuatro mediciones diarias de tres experimentos independientes.

Con los datos de la Figura 4.3.1 se obtuvieron las regresiones lineales (Figura 4.3.2) que muestran las fases lineales de crecimiento de *A. parasiticus* CMUNLP7 en cada tratamiento y control a partir de las cuales se calcularon los parámetros cinéticos.

La curva de crecimiento del hongo creciendo en el medio MEA sin suplementar se hizo lineal aproximadamente entre las 24 y 120 horas. Los parámetros cinéticos que se calcularon a partir de la regresión lineal fueron: $K_D = 0,608 \pm 0,008$ mm/h y una Fase Lag = $14,1 \pm 0,7$ horas.

En el caso del hongo creciendo en el medio MEA-PS sin fermentar la curva de crecimiento se hizo lineal aproximadamente entre las 24 y 96 horas. La K_D obtenida a partir de la regresión lineal fue de $0,829 \pm 0,009$ mm/h, significativamente superior a la calculada para los demás controles, esto puede explicarse por el aporte de algunos metabolitos o nutrientes presentes en el PS que hacen que el hongo aumente su velocidad de crecimiento. La fase Lag calculada fue de $17,6 \pm 0,4$ horas. Pudo observarse que el hongo tardó aproximadamente 3 horas más en comenzar su crecimiento, lo cual indica que la adición de permeado de suero sin fermentar aporta nutrientes que hacen que el hongo tarde en adaptarse al medio, pero sin embargo, una vez adaptado, su velocidad de crecimiento aumenta.

Al igual que en el medio adicionado con PS sin fermentar, la curva de crecimiento del hongo en el medio suplementado con PS acidificado con HCl, se hizo lineal aproximadamente entre las 24 y 96 horas. Presento una K_D de $0,793 \pm 0,006$ mm/h, y una fase Lag de $17,7 \pm 0,5$ horas.

La tasa de crecimiento y la fase de latencia de los medios adicionados con PS acidificado con HCl y con PS sin fermentar fueron superiores significativamente ($P < 0,05$) al medio MEA sin suplementar. Con respecto al medio con PS sin fermentar, la presencia de carbohidratos como lactosa en un $3,33 \pm 0,35\%$ (León, 2013), podría ser causante de una mayor fase de latencia al exigir la adaptación del hongo a ésta; pero igualmente podría ser una fuente de carbono y energía que aceleró la tasa de crecimiento una vez fue superada la fase de adaptación. El efecto de la acidificación del medio MEA adicionado con HCl no

produjo cambios significativos en los parámetros de crecimiento (K_D y Fase Lag) con respecto a lo observado en el medio de cultivo con el agregado de PS sin fermentar.

En el tratamiento con un 25% v/v de PSFG la curva de crecimiento se hizo lineal aproximadamente entre las 24 y 120 horas. La K_D calculada fue de $0,676 \pm 0,006$ mm/h, superior a la calculada para el medio MEA sin suplementar, por lo tanto podría decirse que el PSFG en bajas concentraciones estimula la velocidad de crecimiento. No obstante lo anterior, debe observarse que K_D es inferior a la obtenida con los medios con PS sin fermentar y con PS acidificado con HCl, lo cual podría estar indicando que los ácidos orgánicos débiles presentes el producto fermentado hacen que la velocidad de crecimiento sea inferior a la que presenta el mismo hongo en un medio sin ácidos orgánicos. La fase Lag se calculó en $18,35 \pm 0,7$ horas, significativamente superior a la obtenida con el medio MEA sin suplementar ($P < 0,005$). Por lo tanto, se podría decir que el PSFG en bajas concentraciones, no aporta metabolitos capaces de inhibir el crecimiento fúngico.

Al aumentar la concentración del producto fermentado al 50% v/v, la curva de crecimiento se hizo lineal aproximadamente entre las 48 y 144 horas. La K_D fue de $0,687 \pm 0,007$ mm/h la cual no presentó diferencias significativas con la obtenida en el tratamiento con 25% v/v, mientras que la fase Lag si fue significativamente superior con $36,9 \pm 1,5$ horas, siendo la concentración más baja a la cual la fase Lag fue superior significativamente a la de todos los medios sin SLC PSFG.

Al aumentar la concentración de SLC PSFG al 55% y 60% v/v, la curva de crecimiento se hizo lineal aproximadamente entre las 48 y 144 horas. La K_D calculada fue de $0,636 \pm 0,007$ y $0,659 \pm 0,003$ mm/h para el 55% y 60% v/v respectivamente. Ambos valores fueron superiores a la K_D del medio MEA sin suplementar pero no respecto a los demás medios sin SLC PSFG. La fase de latencia se calculó en $33,3 \pm 1,2$ y $42,6 \pm 0,7$ horas para el 55 y 60% respectivamente. El valor de Lag correspondiente al 60% v/v fue superior significativamente al obtenido al 55% v/v y ambos valores a su vez fueron superiores a los obtenidos con todos los medios sin SLC PSFG y con PSFG al 50% v/v. Por último, al adicionar 62,5% v/v de SLC PSFG, se obtuvo la mayor fase Lag, de $75,35 \pm 1,6$, mientras que la K_D fue de $0,6429 \pm 0,009$.

A una mayor concentración de SLC PSFG como la del 65% v/v no tuvo lugar el crecimiento fúngico, lo cual demuestra la capacidad antifúngica de los SLC PSFG en altas concentraciones. Con base en estos resultados se puede asegurar que la concentración fungicida mínima (CFM) para *A. parasiticus* CMUNLP7 se encuentra entre 62,5 y 65% v/v de SLC PSFG en el medio de cultivo.

Los parámetros cinéticos de los tratamientos realizados se resumen en la Tabla 4.3.2. Estos valores fueron empleados en la determinación de los índices de inhibición del crecimiento (IIK_D ,%) y la relación entre la fase Lag de los tratamientos con la fase Lag del medio MEA sin suplementar ($LagT/LagC$) con los distintos tratamientos, los cuales también se presentan, además de la concentración de ácidos orgánicos en los medios.

Tabla 4.3.2. Parámetros cinéticos y concentraciones de ácidos no disociados en la inhibición de *A. parasiticus* CMUNLP7 con SLC PSFG con gránulo de kefir CIDCA AGK1.

Tratamiento	K_D (mm/h)	Fase Lag (h)	IIK_D (%)	$LagT/LagC$	Ácidos no disociados totales (mM)
MEA s/suplementar	0,608±0,008	14,1±0,7	NC	1,00	NC
MEA+PS s/fermentar	0,829±0,009	17,6±0,4	-36,35	1,25	NC
MEA+PS con HCl	0,793±0,006	17,7±0,5	-30,43	1,26	NC
MEA+PS SLC 25%	0,676±0,006	18,4±0,7	-11,18	1,30	6,08
MEA+PS SLC 50%	0,687±0,007	36,9±1,5	-12,99	2,62	16,45
MEA-PS SLC 55%	0,636±0,007	33,3±1,2	-4,61	2,36	21,04
MEA-PS SLC 60%	0,659±0,003	42,7±0,7	-8,39	3,03	26,99
MEA-PS SLC 62,5%	0,643±0,009	75,4±1,6	-5,74	5,34	31,02
MEA-PS SLC 65%	0	>720	100,00	51,06	34,08

Las concentraciones de ácido láctico y acético de los SLC PSFG sin diluir corresponden a los SLC cuyas concentraciones se indicaron en la Tabla 4.3.1. NC: no calculado.

Se calcularon el índice IK_D y la relación $LagT/LagC$ respecto al medio MEA sin suplementar, teniendo en cuenta que este es el medio basal para el crecimiento del hongo. Este medio se diferencia de los medios con PS sin fermentar y con PS acidificado con HCl, por la presencia del PS y sus metabolitos, principalmente lactosa (alrededor del 3%). Cuando observamos los SLC PSFG en relación a los SLC de PS sin fermentar, hay presencia de lactosa aunque en menor concentración ($2,23 \pm 0,14\%$), no hay diferencia en la concentración de cenizas ($0,2959 \pm 0,0144\%$ p/p), y hay 1,53 veces más del nitrógeno total ($0,0317 \pm 1,7 \times 10^{-5}$) y ácidos láctico (154,14 mM) y acético (41,51 mM). La relación $LagT/LagC$ del tratamiento con 25% de SLC presento un valor bajo, de 1,30, lo cual indica una diferencia mínima entre el MEA sin suplementar y éste, y se refleja en su bajo poder antifúngico general. Este valor fue similar a los encontrados en el medio adicionado con PS sin fermentar (1,25) y el medio con PS acidificado con HCl (1,26). Los tratamientos a 50, 55, 60 y 62,5% v/v de PSFG registraron los mayores $LagT/LagC$, los cuales reflejan un efecto antifúngico mayor que el tratamiento con 25% de SLC, y que se corresponde con la diferencia significativa determinada frente a los controles. No obstante, y como se demostró para las tasas de crecimiento, los índices de inhibición de este parámetro, no fueron positivos, es decir, la tasa de crecimiento no fue inferior en ningún caso a la del control seleccionado, demostrándose que la presencia del PS aporta nutrientes que estimulan el crecimiento fúngico una vez se supera la fase de latencia.

Con respecto a la tasa de crecimiento, al comparar todos los tratamientos entre sí, se encontró que ningún tratamiento supera las tasas de los medios con PS y PS+HCl indicando que los compuestos del PS tienen un efecto estimulante en la velocidad de crecimiento una vez se supera la fase de latencia. También se observó que las tasas de crecimiento de los medios suplementados con SLC PSFG estuvo 0,639 - 0,687 mm/h cuando hubo desarrollo fúngico. No obstante, al evaluar el crecimiento a una concentración cercana de 65% v/v no tuvo lugar el desarrollo fúngico.

La fase de latencia fue diferente entre todas las concentraciones ensayadas y presentó una tendencia a aumentar a medida que aumentaba el porcentaje del producto fermentado en el medio. La mínima concentración a la cual Lag fue superior al medio MEA sin suplementar correspondió al medio con 25% v/v de PSFG, esta fue muy similar a la de los medios

adicionados con PS sin fermentar y PS acidificado HCl. La mayor fase de latencia 75,35 h se observó al 62,5% v/v de PSFG en el medio, con la mayor concentración de ácidos no disociados totales, de 31,02 mM. En conclusión, puede afirmarse que el PSFG a estas concentraciones (entre 50 y 62,5%) aumentó significativamente el tiempo que le lleva al hongo adaptarse al medio y que el parámetro más afectado en la inhibición fúngica con el PSFG fue la fase de latencia. Estos resultados coinciden con los obtenidos con ácidos orgánicos puros y con sobrenadantes libres de células de leche fermentada con gránulos de kefir CIDCA AGK1, en la inhibición de varias cepas de *A. flavus*, donde se demostró que los mayores valores de inhibición se evidencian sobre la fase de latencia y no sobre la tasa de crecimiento (León y col., 2012; León, 2013).

En la Figura 4.3.3 se observa el efecto de la concentración de ácidos no disociados totales presentes en el SLC PSFG sobre el IIK_D y la relación LagT/LagC de *A. parasiticus* CMUNLP7.

Se observa que concentraciones de ácidos no disociados totales entre 0 y 31,02 mM modificaron en escasa proporción la velocidad de crecimiento, ya que el índice IIK_D estuvo -36,35 y 4,61%, es decir que hubo un leve aumento de la velocidad de crecimiento de todos esos tratamientos con respecto al hongo crecido en medio MEA sin suplementar. Por otra parte, entre dichas concentraciones de ácidos no disociados la relación LagT/LagC fue alterada en mayor medida que el índice IIK_D , se observa que esta relación aumentó a medida que se incrementó la concentración de ácidos no disociados totales. Además, concentraciones de ácidos no disociados totales $\geq 34,08$ mM (corresponde a un medio con 65% v/v SLC PSFG) llevaron la inhibición total del crecimiento fúngico, lo que se tradujo en las relaciones LagT/LagC (51,06) e índice IIK_D (100%) más grandes observados.

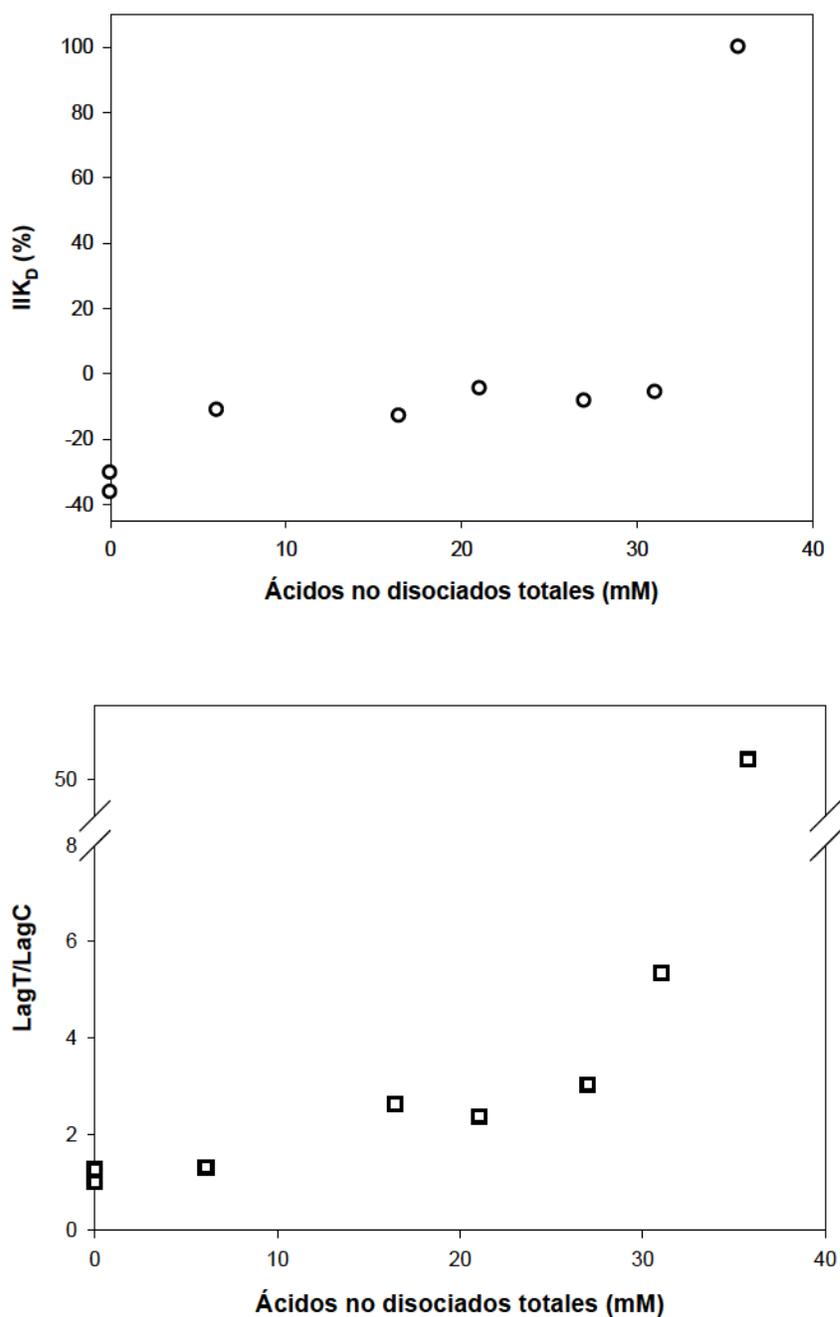


Figura 4.3.3 Índices de inhibición fúngica (IIK_D y LagT/LagC) en función de concentración de ácidos no disociados totales presentes en los medios adicionados o no con SLC PSFG sobre *A. parasiticus* CMUNLP7.

4.3.4 Determinación de la producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* CMUNLP7 desafiado con distintas concentraciones de SLC PSFG en medio sólido.

Se ha reportado que a concentraciones sub-letales de un agente inhibidor, los hongos pueden, una vez superada la concentración inhibitoria, producir mayores concentraciones de micotoxinas que cuando no se someten a ninguna restricción (Milus y Parsons, 1994; D'Mello y col., 1998). Se esperaba, por lo tanto, que habiendo aplicado concentraciones subletales, entre 25 y 62,5% de SLC PSFG en el medio de cultivo, la producción de aflatoxinas hubiese sido variable. Se extrajeron aflatoxinas de los medios de cultivo y se construyó la recta de calibración con los patrones del kit VERATOX (Neogen®) en concentraciones de 0, 5, 15 y 50 ppb. En la Figura 4.3.4 se observan los valores de absorbancia de los patrones en función de la concentración de aflatoxinas. Se observa que la absorbancia de los patrones disminuyó a medida que aumentó la concentración de aflatoxinas debido a que este método es un ELISA competitivo como se indicó en materiales y métodos.

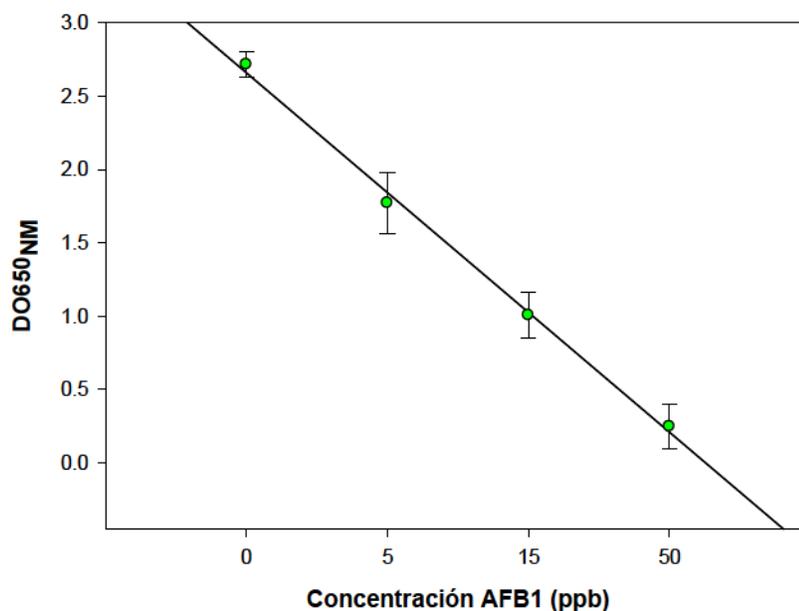


Figura 4.3.4. Regresión lineal del patrón de aflatoxinas del kit VERATOX®.

La primera cuantificación de aflatoxinas se realizó con las muestras originales, sin diluciones, para obtener un dato aproximado de la producción de aflatoxinas obtenida; pero dado que superaban el límite de detección del kit (en la mayoría de los casos), se realizaron diluciones de las muestras y se llevó a cabo la determinación nuevamente. Las concentraciones obtenidas se observan en la Tabla 4.3.3.

Tabla 4.3.3. Concentración de aflatoxina B₁ obtenida en los cultivos de *A. parasiticus* CMUNLP7 desafiados con distintas concentraciones de SLC PSFG.

Tratamientos	Aflatoxinas (ppb)
MEA- PSFG 65% v/v	Nd
MEA- PSFG 62,5% v/v	75,28
MEA- PSFG 60% v/v	87,88
MEA- PSFG 55% v/v	66,10
MEA- PSFG 50% v/v	150,02
MEA- PSFG 25% v/v	99,88
MEA-PS s/fermentar	120,93
MEA- PS c/HCl	107,96
MEA sin suplementar	3,03

Nd: no detectado

Se realizaron diluciones seriadas de las muestras de medio de cultivo en metanol (70% en agua destilada, igual composición que el solvente de extracción) hasta que las concentraciones de aflatoxinas en las muestras quedaron dentro del límite de cuantificación del método empleado. Los valores de absorbancia se extrapolaron a la curva patrón y se calculó la concentración de micotoxina, luego esta se multiplicó por el factor de dilución de la muestra. Los valores obtenidos son los que se presentan en esta Tabla.

En base en los valores obtenidos, se confirmó que *A. parasiticus* CMUNPL7 es un hongo productor de aflatoxinas, tanto cuando se encuentra creciendo en un medio rico en nutrientes, como cuando se encuentra estresado por algún componente del medio de cultivo. Se pudo determinar que existe diferencia en la producción de aflatoxinas entre los

controles y los tratamientos. Cuando el hongo se cultivó en el medio con el menor estímulo (MEA sin suplementar) se determinó la menor producción de aflatoxinas. Esta concentración aumentó con el agregado de PS sin fermentar, lo cual está indicando que existen factores que estimulan la producción de aflatoxina B₁. La acidificación del medio con ácido fuerte (MEA-PS), desencadenó una producción de aflatoxinas menor que con el medio con PS sin fermentar.

En todos los tratamientos con SLC PSFG, se observaron concentraciones de aflatoxinas mayores que la obtenida en el medio MEA sin suplementar, pero estuvieron alrededor de la concentración detectada en el medio MEA adicionado con PS sin fermentar. Esto sugeriría que el PS estimularía la producción de aflatoxina B₁, pero no así los metabolitos provenientes del SLC PSFG. Cuando se adicionó un 50% v/v de SLC PSFG en el medio de cultivo, aumentó levemente la concentración de micotoxina con respecto a los controles. Con concentraciones superiores de SLC PSFG se observa un descenso de la concentración de aflatoxinas indicando que no hay una proporcionalidad entre la concentración de SLC PSFG y la producción de aflatoxinas.

Por otra parte, en medios de cultivo con 65% v/v de SLC PSFG (34,08 mM de ácidos no disociados totales) no se observó presencia de aflatoxinas. Dichos medios correspondieron a los medios con concentraciones fungicidas de SLC PSFG.

Dado que la determinación de aflatoxinas mediante HPLC es un método reconocido (AOAC, 1984), se decidió corroborar los datos obtenidos mediante esta técnica y para repetir los ensayos de algunos tratamientos seleccionados (SLC PSFG 65, 50 y 25%). La metodología para la determinación de aflatoxina B₁ por HPLC se indicó en materiales y métodos. Se realizaron dos ensayos independientes (Figura 4.3.5 a y b). Se observó que en el medio MEA sin suplementar hubo producción de aflatoxina B₁ (a), mientras que en el segundo ensayo (b), no se observó producción de aflatoxina B₁ en las mismas condiciones. Cuando al medio MEA se le adicionó PS sin fermentar, se observó un incremento de la producción de aflatoxina B₁, en ambos ensayos, ésta estuvo alrededor de los 100 ppb. El agregado de PS acidificado con HCl no produjo cambios significativos en la producción de aflatoxina B₁ con respecto al medio MEA adicionado con PS sin fermentar (a), mientras que esta disminuyó a 31,18±5,89 ppb en el segundo ensayo (b). Por otra parte, se observó

un comportamiento coincidente en los dos ensayos cuando se aplicó SLC PSFG al medio MEA, es decir, no hubo producción de aflatoxina B₁ en el medio MEA adicionado con 65% v/v SLC PSFG (SLC con actividad fungicida) y se observó mayor producción de toxina en el medio adicionado con 50% v/v SLC PSFG que en el medio con 25% v/v SLC PSFG. En general, se pudo observar que el PS, por sí solo, aumentó la producción de toxina por parte del hongo y que los SLC PSFG sin acción fungicida, también llevaron a un incremento en la concentración de aflatoxina B₁ en el medio de cultivo.

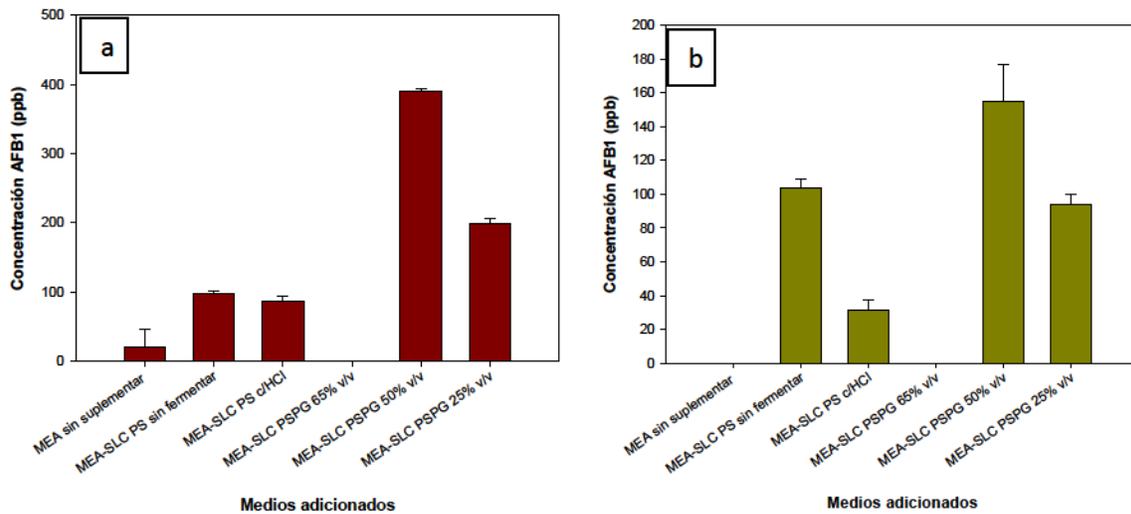


Figura 4.3.5 Producción de aflatoxina B₁ por *A. parasiticus* CMUNLP7 en medio MEA suplementado o no con SLC PSFG en distintas concentraciones determinadas mediante HPLC. Se realizaron dos ensayos independientes (a y b).

Se compararon los resultados obtenidos de cuantificación de aflatoxina B₁ por el método inmunológico y por HPLC en función de la concentración de ácidos no disociados totales presentes en los SLC PSFG. En la Figura 4.3.6 se observa que la producción de aflatoxina B₁ en medios sin SLC PSFG estuvo entre 0 y 120 ppb para el hongo desarrollado en medio MEA y MEA+PS, respectivamente. La producción de aflatoxina B₁ en medio con SLC PSFG aumentó cuando se incrementó la concentración de ácidos no disociados totales hasta 16,45 mM, resultado observado con ambos métodos. Concentraciones mayores a esta produjeron una disminución en la concentración de AFB₁. Por último, en concentraciones \geq a 34,08 mM (concentración fungicida) no se observó producción de aflatoxina B₁.

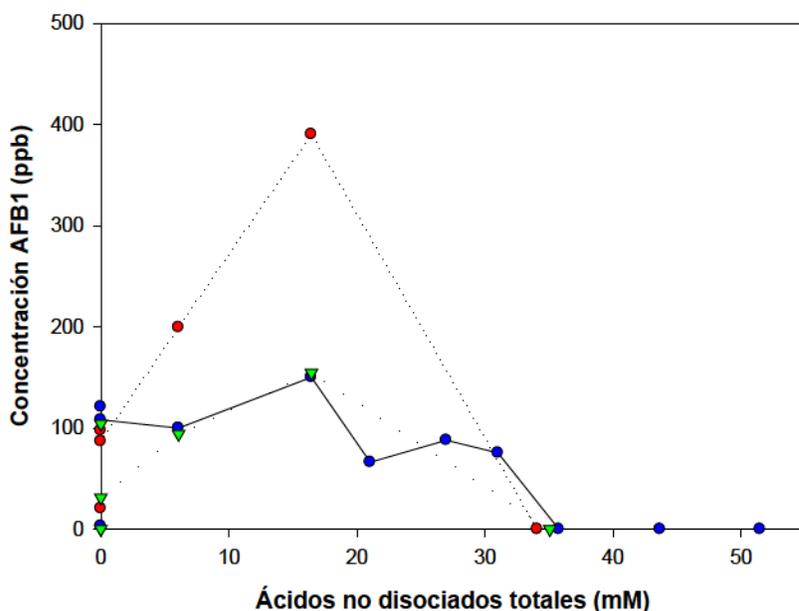


Figura 4.3.6. Concentración de aflatoxinas en función de los ácidos no disociados totales presentes en los SLC PSFG. ● Aflatoxinas medida mediante kit inmunológico. ● AFB₁ medida mediante HPLC (1). ▼ AFB₁ medida mediante HPLC (2). Se realizaron tres ensayos independientes.

4.3.5 Efecto de los ácidos láctico y acético individuales sobre el crecimiento de *A. parasiticus* CMUNLP7 en medio sólido.

Se realizaron ensayos de inhibición en placa de MEA adicionado con distintas concentraciones de ácido láctico y acético individuales con el objetivo de determinar la concentración fungicida mínima (CFM), es decir, la mínima concentración de ácido capaz de producir la muerte fúngica. En la Figura 4.3.7 se presentan las curvas de crecimiento de *A. parasiticus* CMUNLP7 en medio MEA con distintas concentraciones de ácido láctico (a) y acético (b).

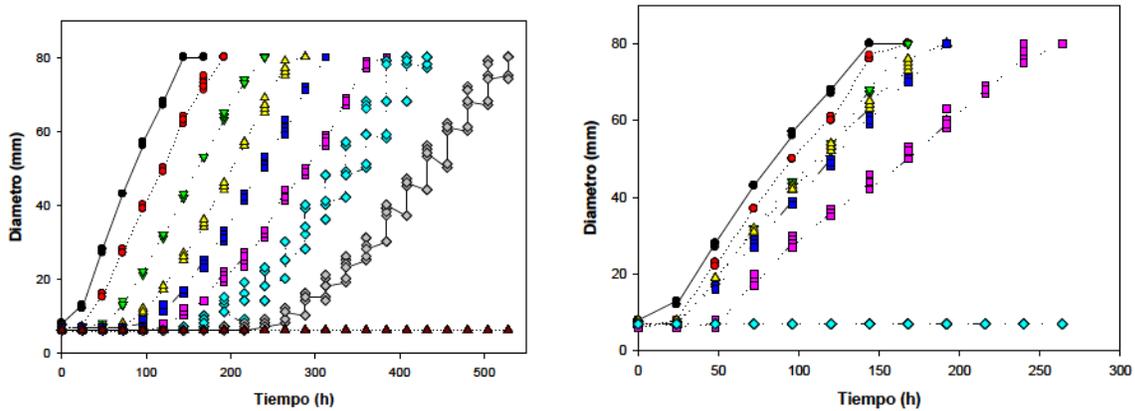


Figura 4.3.7 Curvas de crecimiento de *A. parasiticus* CMUNLP7 en medio MEA con distintas concentraciones de ácido láctico (a) y acético (b). ● MEA sin ácidos orgánicos; ● MEA con 108,38 mM (a) y con 17,32 mM (b); ▼ MEA con 162,58 mM (a) y con 24,25 mM (b); ▲ MEA con 216,77 mM (a) y con 27,71 mM (b); ■ MEA con 270,96 mM (a) y con 31,17 mM (b); ■ MEA con 325,15 mM (a) y con 34,64 mM (b); ◆ MEA con 379,34 mM (a) y con 38,10 mM (b); ◆ MEA con 433,54 mM (a) y ▲ MEA con 460,63 mM (a).

En la Figura 4.3.7 se aprecia que el aumento de la concentración de ácido, tanto láctico (a) como acético (b), produjo un incremento en la fase de latencia y reducción de la velocidad de crecimiento. Se observa también que a la concentración de 460,63 mM y 38,10 mM de ácido láctico y acético se produjo la inhibición total del crecimiento fúngico a lo largo de todo el periodo del ensayo (30 días). Entonces, se tomaron esas concentraciones como la CFM de ácido láctico y acético para *A. parasiticus* CMUNLP7. Estos datos se usaron como base para diseñar las mezclas de ácidos que se probaron a continuación.

4.3.6 Efecto de soluciones mezcla de ácidos orgánicos, sobre el crecimiento de *A. parasiticus* CMUNLP7 en medio sólido

A fin de evaluar el efecto antifúngico de la presencia exclusiva de ácidos orgánicos puros en el medio de cultivo, se cultivó *A. parasiticus* CMUNLP7 en medio MEA adicionado de soluciones con mezcla de ácidos orgánicos puros, correspondientes a 0,06, 0,12, 0,25 y 0,5 veces la concentración presente en la CFM determinada previamente (Sección 4.3.5), según se indicó en los materiales y métodos. Al igual que con los SLC del PSFG, se construyeron

curvas de crecimiento fúngico en milímetros en función del tiempo en horas. A partir de los datos obtenidos se calcularon la tasa de crecimiento K_D (mm/h), fase Lag (h) y el índice IK_D (%) y la relación $LagT/LagC$. El pH final de las mezclas de ácidos en el medio de cultivo se indica en la Tabla 4.3.4, donde se observa que el incremento en la concentración de ácido láctico determinó el descenso del pH en el medio de cultivo, mientras que el ácido acético no generó un descenso fuerte de pH al aumentar su concentración. Otros autores han determinado previamente en la mezcla de estos ácidos, que mientras el láctico cumple la función más acidificante, el acético tiene mayor efecto antifúngico en menores concentraciones (León y col., 2012).

Tabla 4.3.4. pH final en el medio de cultivo de las mezclas de ácidos láctico y acético puros.

Ác. Láctico (mM) \ Ác. acético(mM)	27,1	55,55	115,16	230,32
2,25	4,26	3,83	3,41	2,95
4,50	4,22	3,76	3,45	2,94
9,53	4,15	3,75	3,35	*2,92
19,05	4,12	*3,68	*3,28	*2,88

pH de las mezclas donde tuvo lugar la inhibición total del crecimiento.

El crecimiento de *A. parasiticus* CMUNLP7 en presencia de las mezclas anteriores, se graficó como diámetro (mm) contra tiempo (horas), como se observa en la Figura 4.3.8. En ésta se observa que en las mezclas que incluían la menor concentración de ácido acético (2,25 mM) y las concentraciones más bajas de ácido láctico (27,1; 55,55 y 115,16 mM) no se obtuvo una diferencia significativa en la curva de crecimiento con respecto al control de medio MEA sin suplementar. Al aumentar la concentración de ácido acético 4,50 mM y de láctico a 230,32 mM, se alcanzó la menor pendiente de crecimiento que se observa en la Figura 4.3.8. Las mezclas con las más bajas concentraciones de ácidos donde no se observó

crecimiento fueron de: 9,53 mM ácido acético (AA)/230,32mM ácido láctico (AL) (pH 2,92) y 19,05mM AA/55,55mM AL (pH 3,68).

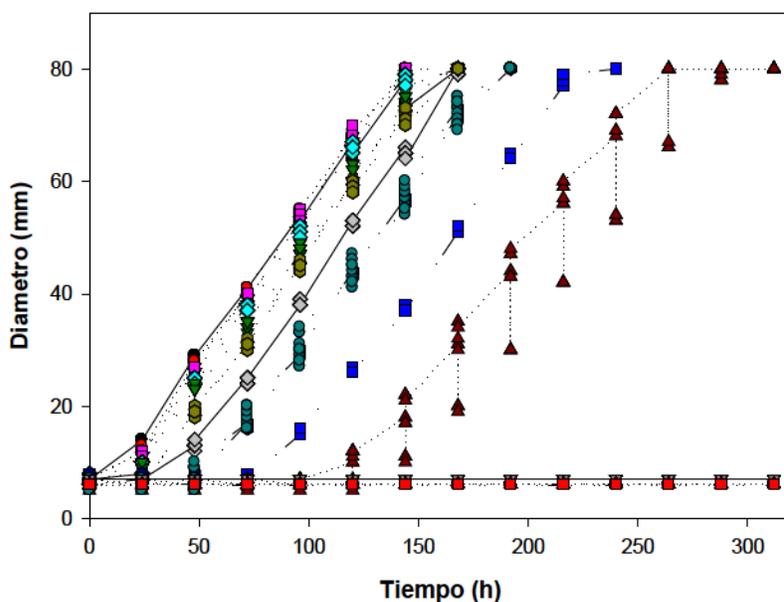


Figura 4.3.8. Curva de crecimiento de *A. parasiticus* CMUNLP7 en presencia de mezclas de ácidos orgánicos puros. ● MEA Sin suplementar; ● MEA con 2,25mM AA-27,1mM AL; ▼ MEA con 2,25mM AA-55,55mM AL; ▲ MEA con 2,25 mM AA-115,16mM AL; ■ MEA con 2,25 mM AA-230,32mM AL; ■ MEA con 4,50mM AA-27,10mM AL; ◆ MEA con 4,50 mM AA-55,55mM AL; ◆ MEA con 4,50mM AA-115,16mM AL; ▲ MEA con 4,50mM AA-230,32mM AL; ▼ MEA con 9,53mM AA-27,1mM AL; ● MEA con 9,53mM AA-55,55mM AL; ● MEA con 9,53mM AA-115,16mM AL; ● MEA con 9,53mM AA-230,32mM AL; ● MEA con 19,05mM AA-27,1mM AL; ▼ MEA con 19,05mM AA-55,55mM AL; ▲ MEA con 19,05mM AA-115,16mM AL; ■ MEA con 19,05mM AA-230,32mM AL. AA: ácido acético. AL ácido láctico.

Para cuantificar el efecto inhibitor, se calcularon las concentraciones de ácidos no disociados en las mezclas y los parámetros de crecimiento que se presentan en la Tabla 4.3.5.

Tabla 4.3.5. Parámetros cinéticos del crecimiento de *A. parasiticus* CMUNLP7 en presencia de mezclas de ácidos Láctico y Acético puros.

Mezclas de ácidos: AA (mM) / AL (mM)	pH final	K _D (mm/h)	Fase Lag (h)	IK _D (%)	LagI/ LagC	AL no disociado (mM)	AA no disociado (mM)	Aflatoxina B ₁ (ppb) por HPLC
MEA sin ácidos orgánicos	6,5	0,603± 0,008	14,1 ± 0,7	0	1,00	ND	ND	31,18± 3,04
2,25/27,10	4,26	0,545± 0,003	10,0 ± 0,3	9,62	0,71	6,86	1,70	136,64± 31,43
2,25/55,55	3,83	0,551± 0,009	12,0 ± 1,2	8,62	0,85	26,50	2,01	248,96± 1,88
2,25/115,16	3,41	0,578± 0,002	26,0 ± 1,1	4,15	1,84	81,28	2,15	117,74± 29,43
2,25/230,32	2,95	0,524± 0,001	82,8 ± 0,9	13,10	5,87	201,23	2,22	378,66± 1,40
4,50/27,10	4,22	0,572± 0,002	15,0 ± 1,0	5,14	1,06	7,34	3,77	101,78± 3,71
4,50/55,55	3,76	0,569± 0,007	15,9 ± 0,3	5,64	1,13	28,73	4,09	231,06± 1,43
4,50/115,16	3,45	0,558± 0,006	39,0 ± 1,2	7,46	2,77	79,03	4,29	278,05± 16,71
4,50/230,32	2,94	0,470± 0,050	118,8 ± 8,9	22,06	8,37	201,81	4,43	277,76± 17,12
9,53/27,10	4,15	0,530± 0,010	16,7 ± 0,8	12,11	1,18	8,23	7,62	140,89± 3,44
9,53/55,55	3,75	0,551± 0,006	25,8 ± 0,4	8,62	1,83	29,05	8,66	210,05± 1,34
9,53/115,16	3,35	0,525± 0,003	51,0 ± 0,3	12,94	3,62	84,49	9,17	222,58± 22,25
9,53/230,32	2,92	0	>720,0	100,00	51,06	202,94	9,39	Nd
19,05/27,10	4,12	0,520± 0,010	47,0 ± 3,1	13,77	3,33	8,63	15,43	102,98± 0,18
19,05/55,55	3,68	0	>720,0	100,00	51,06	31,27	17,56	Nd
19,05/115,16	3,28	0	>720,0	100,00	51,06	87,97	18,43	Nd
19,05/230,32	2,88	0	>720,0	100,00	51,06	205,09	18,80	Nd

AA: ácido acético; AL: ácido láctico. Nd: no detectado.

En la Tabla 4.3.5 se muestran los parámetros cinéticos calculados a partir de las regresiones lineales de las curvas de crecimiento, el índice IIK_D y la relación $LagT/LagC$, y la concentración de ácidos orgánicos no disociados. Se pudo observar que el efecto antifúngico causado por las mezclas de ácidos se expresaba tanto en el aumento de la fase de latencia como en la disminución de la tasa de crecimiento.

Al comparar los tratamientos en los cuales se mantuvo constante la concentración de ácido acético en 2,25 mM y se aumentó la concentración de ácido láctico desde 27,1 mM a 55,55 mM, no se observaron diferencias significativas en K_D ni en Lag . Al aumentar la concentración de ácido láctico a 115,16 mM, K_D y Lag aumentaron significativamente respecto a los dos tratamientos anteriores. Cuando la concentración de ácido láctico fue de 230,32 mM, K_D disminuyó, hasta llegar a un valor de 0,524 mm/h, siendo este valor significativamente inferior a los demás tratamientos de este bloque y la fase de latencia aumento significativamente respecto de los tratamientos anteriores, lo cual indica que a mayor concentración de ácido láctico en el medio, el hongo tarda más en adaptarse.

Comparando en segundo lugar los tratamientos en los cuales se mantuvo constante la concentración de ácido acético en 4,5 mM, se observó una leve disminución en K_D , pero sin diferencias, significativas cuando la concentración de ácido láctico aumenta de 27,1 mM hasta 115,16 mM. En estos casos la fase de latencia aumentó significativamente. Al aumentar la concentración de ácido láctico hasta 230,32 mM, se observó que K_D disminuyó significativamente con respecto a los tratamientos anteriores y la fase Lag también aumentó significativamente, llegando a un valor máximo de 118,80 horas. Esto está indicando que ácido láctico juega un papel importante en la adaptación del hongo al medio de cultivo. Los tres tratamientos con 9,53 mM de ácido acético no presentaron diferencias significativas en K_D , pero si presentan diferencias significativas en cuanto a fase Lag , observando que a medida que aumenta la concentración de ácido láctico, aumenta la fase de latencia. Incluso podría decirse que a concentraciones altas de ácido láctico se inhibe el crecimiento al no observarse crecimiento en el tratamiento con 9,53 mM de ácido acético y 230,32 mM de ácido láctico (con una concentración de ácidos no disociados totales de 212,33 mM). Cuando se aumentó la concentración de ácido acético a 19,05 mM solo se observó crecimiento cuando el hongo creció en un medio con baja concentración de ácido láctico

(27,10 mM), lo cual está indicando que altas concentraciones de los dos ácidos orgánicos producen la inhibición fúngica. A concentraciones mayores de ácido láctico pero constante de ácido acético, no se observó desarrollo fúngico y correspondieron a mezclas con concentraciones de ácidos no disociados totales de 48,83 mM, 106,40 mM y 223,84 mM.

Comparando ahora los tratamientos en los cuales se mantuvo constante la concentración de ácido láctico, se puede observar, en el caso de mantenerse la concentración de 27,1 mM, que no se encuentran diferencias significativas en las K_D correspondientes a los tratamientos con 2,25, 4,5 y 9,53 mM de ácido acético, pero si hay diferencia significativa en el tratamiento con 19,05 mM. En cuanto a la fase Lag no se observan diferencias significativas entre los tratamientos con 4,5 mM y 9,53 mM de ácido acético. En los dos casos restantes si se observan diferencias. Cuando se mantuvo constante el ácido láctico en una concentración 55,55 mM y se varió la concentración de ácido acético, las K_D no presentaron diferencias. En los tratamientos con 115,16 mM de ácido láctico y diferentes concentraciones de ácido acético, las K_D no presentaron diferencias, pero en este caso las fases de latencia resultaron todas significativamente diferentes.

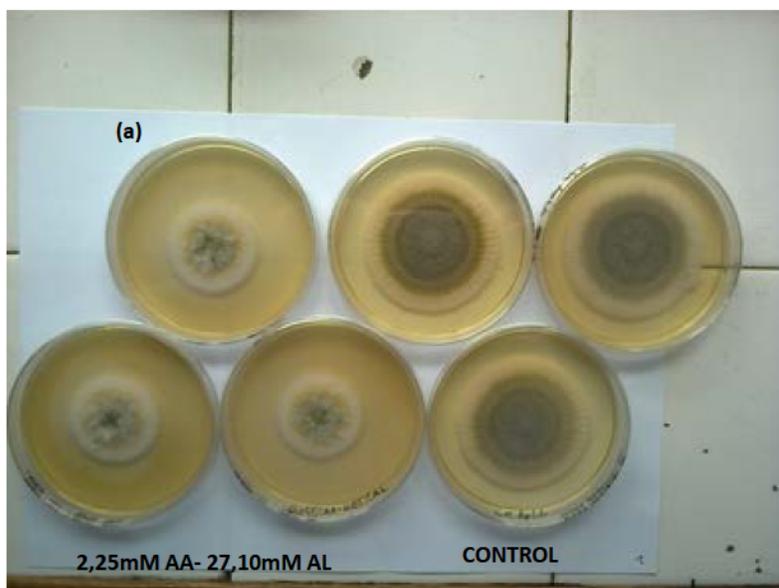
Cuando se aumentó la concentración de ácido láctico hasta un 230,32 mM se produjo la inhibición de crecimiento fúngico en los tratamientos que contenían mayores concentraciones de ácido acético (9,53 mM y 19,05 mM) y en los dos tratamientos con concentraciones inferiores se observaron K_D y fases Lag con diferencias significativas.

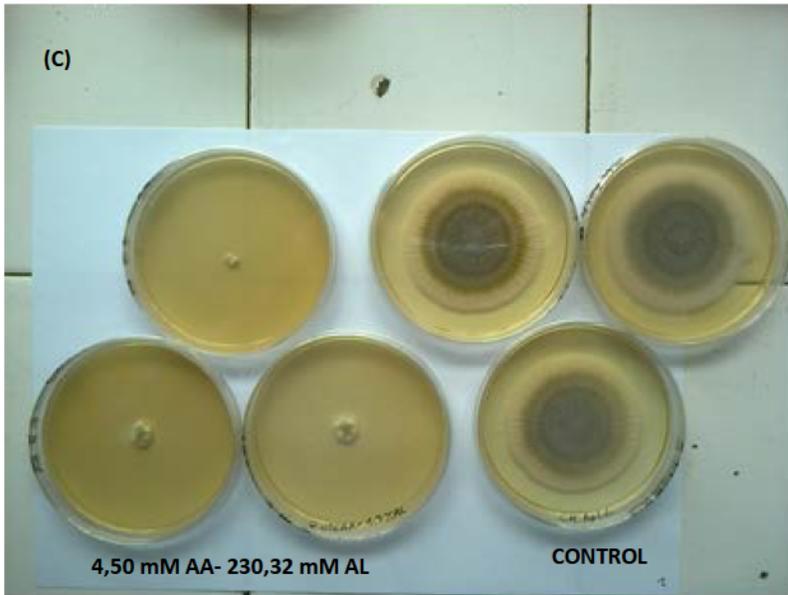
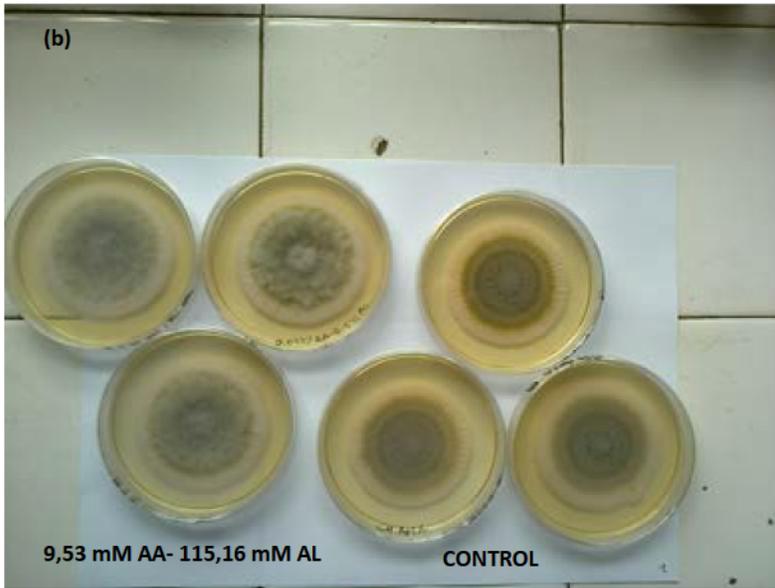
La mínima concentración de mezcla donde el ácido acético estuvo en su menor concentración y no hubo crecimiento fúngico fue la mezcla de 9,53 mM: 230,32 mM de ácido acético y láctico respectivamente (con 212,33 mM de ácidos no disociados totales) a pH de 2,92. Mientras que la mínima concentración de mezcla donde el ácido láctico estuvo en su menor concentración y no hubo crecimiento fúngico fue la mezcla de y 19,05mM: 55,55 mM de ácido acético y láctico respectivamente (con 48,83 mM de ácidos no disociados totales), a pH de 3,58. Si observamos el índice CIF de estas mezclas (recordemos que si éste es menor a 1, igual a 1 o mayor a 1 indica que hay en efecto sinérgico, de adición o antagónico entre los ácidos, respectivamente), en ambos casos es menor a 1, específicamente de 0,75 para la mezcla con 212,33 mM de ácidos no disociados totales y de 0,67 para la mezcla con 48,83 mM de ácidos no disociados totales.

Dado que la última mezcla presenta un índice CIF mas bajo y disminuye menos el valor de pH y en consecuencia alteraría menos las propiedades sensoriales de un producto alimentario, se podría recomendar la aplicación de ésta en caso de ser como perseverante antifúngico. Igualmente, se comprueba la acción sinérgica de la mezcla, dado que se necesita la mitad de la concentración del ácido acético y 1/8 de la concentración de ácido láctico cuando se emplean individualmente. Estos resultados se corresponden con la mínima mezcla de ácidos láctico y acético determinada para lograr la inhibición de *A. flavus* AFUNQ6 de 78 mM ácido láctico y 31.2 mM de ácido acético a pH 3,40, los cuales estuvieron 4,6 y 1,3 veces por debajo de sus valores de concentración inhibitoria mínima (León y col., 2012).

El aumento de concentración de ácidos generó un patrón en la producción de aflatoxina B₁. La mínima producción se obtuvo en el control, mientras que llegó a aumentar 10 veces en presencia de las mezclas de ácidos. A medida que aumentaba la concentración de ácido láctico en el medio, la concentración producida aumentaba mientras que las concentraciones de aflatoxina no variaron significativamente con los cambios de la concentración de ácido acético. De estos experimentos y de los anteriores se puede concluir que la presencia de un compuesto cuyo efecto inhibitor puede ser superado por el hongo causará un incremento en la producción de micotoxinas con respecto a la obtenida en ausencia del factor de estrés.

En la Figura 4.3.9 se observa el crecimiento o no de *A. parasiticus* CMUNLP7 frente a algunas de las mezclas de ácidos orgánicos probadas.





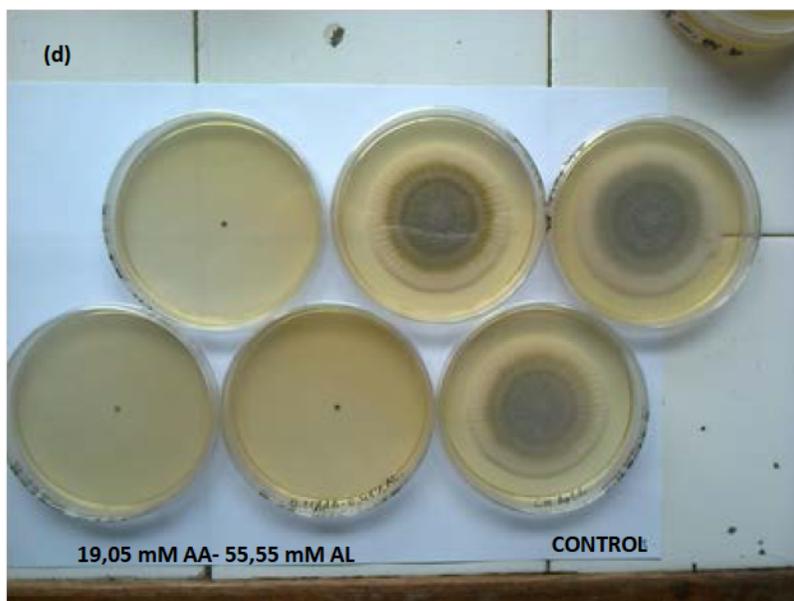


Figura 4.3.9. Crecimiento de *A. parasiticus* CMUNLP7 en presencia de diferentes mezclas de ácidos láctico y acético puros. (a) 2,25mM AA - 27,10mM AL. (b) 9,52mM AA - 115,16mM AL. (c) 4,26mM AA - 230,32mM AL, (d) 19,05mM AA - 55,55mM AL. Las fotografías se tomaron a los 5 días de crecimiento.

La Figura 4.3.9 (a) corresponde al tratamiento 2,25mM AA- 27,1mM AL vs control de MEA sin suplementar. En este caso no se observó casi inhibición, debido a que la concentración de ácidos orgánicos es baja, como para ejercer algún efecto sobre el crecimiento del hongo. La figura (b) corresponde al tratamiento 9,52mM AA - 115,16mM AL, en el cual se pudo observar el efecto inhibitor mayor sobre el crecimiento fúngico que causaron los ácidos orgánicos. La figura (c) corresponde al tratamiento 4,26mM AA - 230,32mM AL vs el control MEA sin ácidos donde puede observarse un fuerte efecto inhibitorio provocado por el aumento de la concentración de ácidos orgánicos puros. La figura (d) corresponde al tratamiento 19,05mM AA - 55,55mM AL vs el control MEA sin suplementar donde se hace evidente el efecto antifúngico que ejercen dichas concentraciones de ácidos orgánicos.

A los fines de facilitar la comparación de los datos obtenidos se representó el índice III_{K_D} , la relación $LagT/LagC$ y la producción de aflatoxina B_1 en función de la concentración de ácidos no disociados totales determinados en las mezclas de ácidos ensayadas (Figura 4.3.10).

Se observa que la velocidad de crecimiento es escasamente alterada por las mezclas de ácidos cuando están no tienen acción fungicida. Esto se refleja con bajos índices IIK_D (Figura 4.3.10.a) que estuvieron entre 4,51 y 22,06%. Como se dijo anteriormente hubo 4 mezclas fungicidas con índices IIK_D del 100%. Por otra parte, en la relación $LagT/LagC$ (Figura 4.3.10.b) se observó una tendencia similar, valores de $LagT/LagC$ entre 0,71 – 8,37 (valores menores a 1 indican que la fase Lag de dicho tratamiento fue menor a la del medio MEA control sin suplementar) cuando la mezclas de ácidos no fueron fungicidas y valores de $LagT/LagC$ máximos con mezclas fungicidas. En otra parte, la producción de aflatoxina B_1 (Figura 4.3.10.c) estuvo entre $31,18 \pm 3,04$ ppb (MEA sin ácidos orgánicos) y $378,66 \pm 1,40$ ppb (MEA con 203,45 mM de ácidos no disociados totales), y las dos concentraciones máximas de toxina se produjeron en los medios con máximas concentraciones de ácidos no disociados totales sin acción fungicida (mezcla con 2,25 mM / 230,32 mM y 4,50 mM / 230,32 mM de ácido acético y láctico, respectivamente). En las mezclas de ácidos con acción fungicida no se observó producción de aflatoxina B_1 .

En resumen, en las mezclas de ácidos con actividad fungicida produjeron la inhibición total de crecimiento fúngico dando como resultados los mayores índices IIK_D (Figura 4.3.10a círculo rojo) y $LagT/LagC$ (Figura 4.3.10b círculo azul). Además, en medios de cultivo con dichas mezclas de ácidos no se detectaron aflatoxinas (Figura 4.3.10c círculo verde). Las mezclas de ácidos mencionadas tuvieron efecto sinérgico (índices CIF entre 0,67 y 0,75) sobre la inhibición de sobre *A. parasiticus* CMUNLP7. Es importante destacar que todas las mezclas señaladas con los círculos tuvieron actividad fungicida. Las mezclas con actividad fungicida tuvieron entre 48,33 y 223,89 mM de ácidos no disociados totales (Tabla 4.3.6).

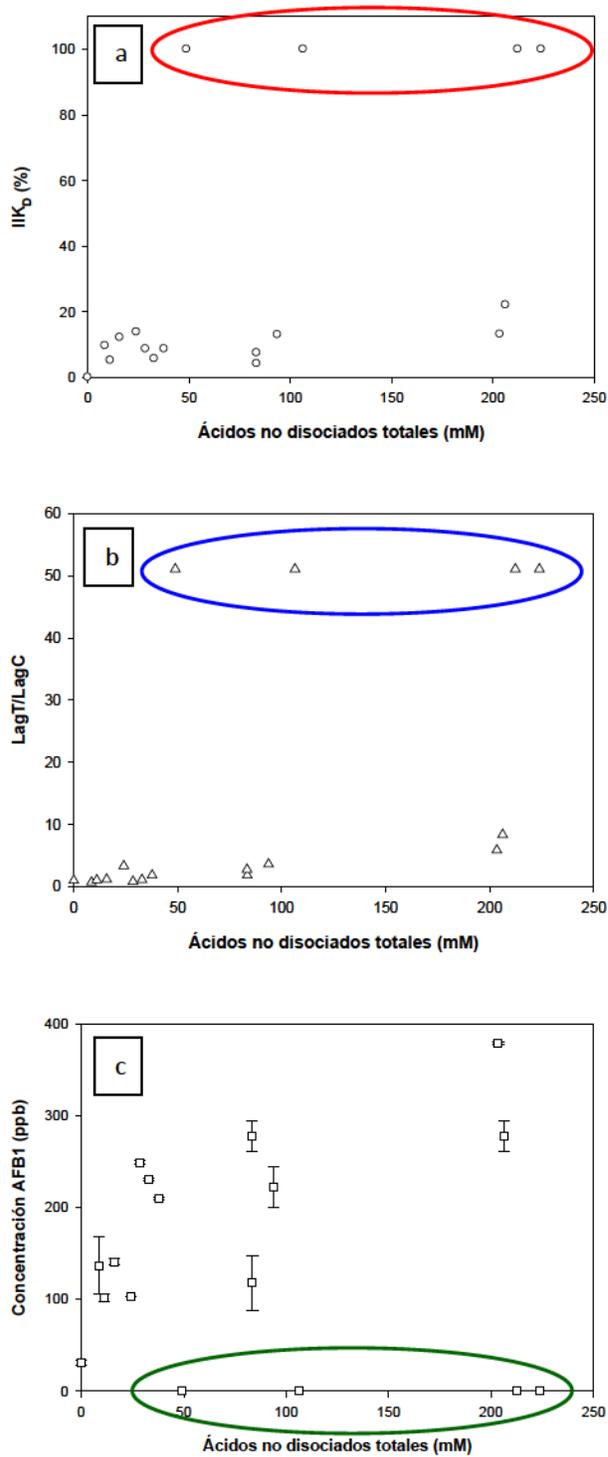


Figura 4.3.10. IIK_D (a), LagT/LagC (b) y concentración de aflatoxina B₁ (c) por *A. parasiticus* CMUNLP7 en función de la Concentración de ácidos no disociados totales presentes en las mezclas de ácidos láctico y acético ensayadas.

Se observó que para que las mezclas de ácidos sean fungicidas deben contener una concentración de ácido acético no disociado $\geq 17,56$ mM y la concentración de ácido láctico no disociado $\geq 31,27$ mM. Sin embargo, si se utiliza una mezcla con una concentración de ácido láctico mayor a 202 mM, se necesitaron 9,39 mM de ácido acético no disociado para producir actividad fungicida. Por otra parte, todas las mezclas con una concentración $\leq 15,43$ mM de ácido acético no disociado y $\leq 201,81$ mM de ácido láctico no disociado resultaron ser no fungicidas.

Por otro lado, si comparamos la mínima concentración de SLC PSFG capaz de tener actividad fungicida sobre *A. parasiticus* CMUNLP7 en medio sólido que fue el medio con 65% v/v de SLC PSFG con los resultados obtenidos con las mezclas de ácidos, donde la mínima mezcla de ácidos orgánicos puros capaz de producir la misma actividad sobre *A. parasiticus* CMUNLP7 (19,05mM: 55,55 mM de ácido acético y láctico, respectivamente y un índice CIF=0,67) se aprecia que en el medio con SLC PSFG hubo 34,08 mM de ácidos no disociados totales mientras que en el medio con la mezcla de ácidos hubo 48,83 mM de ácidos no disociados totales. Es decir, las mezclas de ácidos láctico y acético sin presencia de SLC PSFG, requirieron 1,43 veces mayor concentración de ácidos no disociados totales que la mezcla presente en el medio con SLC PSFG.

Por lo observado, podría sugerirse que el efecto inhibitorio de los sobrenadantes de kefir se debería parcialmente a los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos del kefir, y que el poder inhibitorio de los sobrenadantes debe involucrar otros metabolitos.

4.3.7 Efecto antifúngico y sobre la producción de aflatoxinas de la adición de PSFG a alimento para pollos.

El alimento para pollos puede servir como sustrato para el desarrollo de una amplia variedad de microorganismos. Si bien algunas bacterias pueden crecer en éste, los hongos son los principales contaminantes gracias a su resistencia a la baja actividad acuosa. 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. 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).

Denli y col (2005) observaron un aumento del peso de hígado y lesiones hepáticas en pollos alimentados con dietas que contenían 1mg AFB₁/kg de alimentación y también han informado aumentos significativos en el peso relativo del bazo de pollos de engorde (Bailey y col., 2006; Shi y col., 2006). Según este estudio, la administración de 1 mg AFB₁/kg de alimento causa una disminución en la tasa de conversión de alimento comparado con un control (sin administración de AFB₁), y con esta misma dieta, los niveles residuales de AFB₁ en hígado de pollos son de 0,166 g/kg. Los residuos de AFB₁ y sus metabolitos, que se encuentran en los huevos y el tejido muscular después del consumo de las dietas contaminadas, son menores que en hígado (Denli y col., 2004; Arulmozhi 2002). Esta concentración también afecta gravemente el rendimiento reproductivo (Fernandez y col. 1994; Denli y col., 2004). Los efectos adversos de la aflatoxina B₁ en el crecimiento se han relacionado con la disminución en la concentración de proteínas y menor utilización de la energía, probablemente como consecuencia del deterioro del aparato digestivo y la eficiencia metabólica (Dalvi y Ademoyero, 1984; Verma y col., 2002).

Por todo lo mencionado previamente, la adición del PSFG tuvo como finalidad primordial aportar microorganismos probióticos y ácidos orgánicos al alimento para pollos con el fin de evaluar la inhibición del crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas. Para ello se determinó inicialmente la a_w del alimento para pollos entre 0,65 – 0,72, una vez se compra y se abre la bolsa. Por lo tanto, en un primer momento se evaluó la capacidad antifúngica del PSFG adicionado al alimento y llevado a la a_w original. Para ello se

adicionó el PSFG en diferentes concentraciones al alimento y el mismo se secó hasta alcanzar una a_w de 0,65. A continuación, se contaminó el alimento con 1 ml de una solución conteniendo 1×10^4 conidios/ml por cada 100 g de alimento. Se determinó que a esta a_w no tenía lugar el crecimiento fúngico ni en los controles, ni en los diferentes tratamientos debido a que a esta actividad acuosa fue inferior a la mínima que se reporta en la literatura como mínima para el crecimiento de *A. parasiticus*, de 0,85 (Carrillo, 2003).

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 Tančinov, 2006). Por lo tanto se decidió secar el alimento adicionado con PSFG hasta un valor de actividad acuosa óptima para el crecimiento del hongo de 0,95. Dado que la adición de concentraciones diferentes de producto fermentado al alimento generaba cambios diferentes en su a_w , se determinó este valor y se controló el tiempo necesario para que cada tratamiento alcanzara la a_w final de 0,95, lo cual se observa en la Tabla 4.3.6.

Tabla 4.3.6. a_w y tiempo de secado del alimento para pollos adicionado de PSFG

Tratamientos	a_w del alimento adicionado	a_w final del alimento secado	Tiempo de secado a 50 °C (min)	pH final
Alimento+Agua,100% v/p	0,988	0,943	240	6,82
Alimento+PS sin fermentar, 100% v/p	0,984	0,948	240	6,79
Alimento+PSFG (pH 3,6), 100% v/p	0,984	0,957	240	6,23
Alimento+PSFG (pH 3,6), 65% v/p	0,978	0,941	60	6,43
Alimento+PSFG (pH 3,6), 50% v/p	0,976	0,943	60	6,54
Alimento+PSFG (pH 3,6), 25% v/p	0,946	0,946	0	6,69

Según se observa en la Tabla 4.3.7 se determinó que la a_w del alimento se incrementaba al adicionar el producto fermentado, excepto en la concentración del 25% v/p. Por lo tanto esta última no fue secada.

El estudio de la resistencia a la contaminación artificial se basa en determinar los días necesarios para hacerse visible el hongo en un alimento contaminado artificialmente con un orden de 10^4 conidios/ml por cada 100 g de alimento (Gerez y col., 2009; Londero y col., 2014). Para determinar este tiempo, se observó diariamente el alimento contaminado, tal como se observa en la Tabla 4.3.7.

Tabla 4.3.7. Resistencia a la contaminación artificial del alimento para pollos adicionado con PSFG.

Tratamiento	Días transcurridos cuando apareció la contaminación visible		
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Alimento+H ₂ O (v/p)	4±1,5	4±2,5	5±1,7
Alimento+PS sin fermentar (v/p)	4±0,2	4±1,5	6±2,6
Alimento+PSFG 25% v/p	5±2,3	14±2,0	5±3,9
Alimento+PSFG 50% v/p	8±4,6	19±2,5	9±1,4
Alimento+PSFG 65% v/p	10±3,3	18±0,6	11±1,8
Alimento+PSFG 100% v/p	21±4,5	27±5,0	17±2,4

La adición de PSFG en concentración del 100 % p/v al alimento para pollos, aumentó la resistencia a la contaminación artificial; pasando de entre 4 - 6 días en el alimento control (adicionado con agua o PS sin fermentar) a entre 17 - 27 días en el alimento adicionado de la concentración antes mencionada.

Mientras que el alimento para pollos adicionado con menores concentraciones de PSFG tuvieron un tiempo en días similar al de los controles. Los resultados obtenidos permiten concluir que la adición del PSFG al alimento para pollos en una alta concentración tiene el potencial de aumentar significativamente su resistencia a la contaminación con hongos filamentosos. No obstante, a bajas concentraciones del PSFG no hubo efecto antifúngico. Lo anterior se observa en la Figura 4.3.11 donde se presenta el desarrollo fúngico en las concentraciones del 25% v/p.



Figura 4.3.11. Aparición visible de *A. parasiticus* CMUNLP7 en alimento para pollos adicionado con PSFG. Fotografías tomadas después de 4 días del ensayo.

La adición de PSFG al alimento para aves, en todas las concentraciones ensayadas aumentó el tiempo en que se hizo visible la aparición de hongo (Tabla 4.3.8), pero a bajas concentraciones estas diferencias de tiempos no son tan importantes. Con la concentración más baja ensayada de PSFG (25% v/p) el hongo tardó entre 5 – 14 días en hacerse visible mientras que en los dos controles utilizados (alimento con PS fermentar o agua) apareció entre los 4 – 6 días. Al aumentar la concentración del producto fermentado entre 50 y 65% v/p, se observó un retraso en la visibilidad del hongo, llegando a hacerse visible entre los 8

– 19 días de almacenamiento. Por último, cuando el PSFG se adicionó al alimento en una concentración del 100% v/v, se observó la aparición del hongo a los tiempos más largos de almacenamiento, entre 17 - 27 días de contaminado el alimento. Estos resultados están en coincidencia con los obtenidos por Londero y col. (2014), quienes observaron que la adición de suero fermentado (en lugar de permeado de suero, como fue en nuestro caso) con gránulos de kefir CIDCA AGK1 produjo incrementos significativos en el número de días necesarios para la aparición visible de *A. parasiticus* NRRL 2999 de $11,0 \pm 7,0$ días en los alimentos controles hasta los $27,3 \pm 6,4$ días en los alimentos suplementados con 100% v/p de suero fermentado.

La determinación de la concentración de ácido láctico y acético en el alimento adicionado con PSFG al 100% mostró que había 12,87 mM y 4,50 mM de ácido láctico y acético, respectivamente, y la sumatoria de las formas no disociadas de ambos era 1,39 mM. Esto sugiere que el aumento de la resistencia a la contaminación artificial del alimento para pollos se debería a otros metabolitos presentes en el PSFG, además de los ácidos orgánicos estudiados.

Se realizaron extracciones de aflatoxinas del alimento para pollos adicionado o no con PSFG a los días 7 y 27 de almacenamiento (Tabla 4.3.8) y se cuantificaron mediante el kit inmunológico Veratox[®], obteniendo los resultados que se presentan en la Tabla 4.3.8.

Se pudo determinar que no hubo producción de aflatoxina B₁ durante los primeros 7 días de almacenamiento del alimento contaminado artificialmente. Sin embargo, se detectó aflatoxinas en todos los tratamientos almacenados durante 27 días, siendo menor en los dos tratamientos controles con agua o PS sin fermentar (entre 3,47 – 3,48 ppb) y aumentando en todos los alimentos con PSFG adicionado. Esto sugiere que el agregado de PSFG al alimento favoreció la producción de toxina por el hongo.

Tabla 4.3.8. Concentración de aflatoxina B₁ en el alimento para pollos contaminado artificialmente con *A. parasiticus* CMUNLP7.

Tratamiento	Aflatoxinas (ppb)	
	Día 7	Día 27
Alimento+Agua 100% (v/p)	Nd	3,47
Alimento+PS sin fermentar 100% (v/p)	Nd	3,48
Alimento+PSFG 100% (v/p)	Nd	24,22
Alimento+PSFG 65% (v/p)	Nd	25,23
Alimento+PSFG 50% (v/p)	Nd	25,12
Alimento+PSFG 25% (v/p)	Nd	18,98

La determinación de aflatoxinas se realizó mediante kit Veratox. Nd: no detectado.

Adicionalmente, en los ensayos 2 y 3 (Tabla 4.3.7), se modificó la técnica de extracción y determinación de aflatoxina B₁ pasando al HPLC (AOAC, 1984). En estos dos ensayos sólo se detectó producción de aflatoxina B₁ en un tratamiento a los 27 días de almacenamiento, correspondiente al PSFG adicionado al alimento al 100% v/p. La concentración de aflatoxina B₁ encontrada en este caso varió entre $38,50 \pm 9,32$ y $45,78 \pm 6,96$ ppb de aflatoxina B₁ para el ensayo 2 y 3, respectivamente. Durante los primeros 7 días de almacenamiento, no se detectó aflatoxina B₁ en ninguno de los tratamientos.

Observando sólo los datos de aparición visible del hongo en el alimento, se considera que el PSFG podría llegar a utilizarse como conservante de alimentos para aves, al retrasar el crecimiento fúngico en comparación con los controles que contenían agua o PS sin fermentar, pero al evaluar la concentración de aflatoxinas producidas por el hongo en cada tratamiento se observó la misma tendencia que en los ensayos de inhibición en placa. Esto es, que la adición del producto fermentado, en concentraciones inferiores a las fungicidas, estimula la producción de aflatoxinas, por lo tanto, mientras no haya una inhibición total del crecimiento fúngico, no es un buen producto para utilizarse como conservante ya que

una vez que el hongo supera el factor inhibitorio crece y produce mayor cantidad de aflatoxina B₁.

Se pudo observar que la concentración de aflatoxina B₁ producida fue mayor con el PSFG agregado al alimento en una concentración del 100% v/v. En los tratamientos con distintos agregados de PSFG (entre 25 y 65% v/v) no se determinó presencia de aflatoxina B₁ mediante HPLC.

En paralelo a los estudios de resistencia a la contaminación artificial, se siguió el recuento de hongos filamentosos en el alimento adicionado de PSFG al 100% v/p almacenado a 20°C, durante 30 días. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 4.3.9.

Tabla 4.3.9. Evolución de los hongos filamentosos naturales del alimento para pollos adicionado con PSFG (1:1) durante 30 días de almacenamiento a 20°C.

Tratamiento	Día	Recuento hongos (UFC/g)
Alimento+PSFG 100% (v/p)	0	$8,30 \times 10^2 \pm 1,91 \times 10^1$
	15	$1,12 \times 10^3 \pm 3,16 \times 10^2$
	30	$2,71 \times 10^3 \pm 3,11 \times 10^2$
Alimento+PS sin fermentar 100% (v/p)	0	$1,88 \times 10^3 \pm 2,41 \times 10^2$
	15	$3,43 \times 10^3 \pm 1,71 \times 10^2$
	30	$1,12 \times 10^4 \pm 2,96 \times 10^3$
Alimento+Agua 100% (v/p)	0	$9,11 \times 10^2 \pm 2,31 \times 10^1$
	15	$4,52 \times 10^3 \pm 5,02 \times 10^2$
	30	$3,27 \times 10^4 \pm 2,15 \times 10^3$

En esta investigación se quiso determinar adicionalmente si el secado del alimento influye en la contaminación fúngica natural, para lo cual se hicieron los recuentos del alimento adicionado con agua, PS sin fermentar y con PSFG. El alimento adicionado con agua tuvo el mayor recuento al día 30, seguido del alimento con PS sin fermentar; mientras que el mínimo recuento en un orden por debajo, se obtuvo en el alimento adicionado de PSFG. Los resultados obtenidos indican que el secado puede ejercer un efecto protector en los primeros 15 días de almacenamiento para todos productos que pasaron por el horno de convección, pero este efecto se pierde para el día 30, en el alimento con agua y PSFG. El

PSFG protegió el alimento al mantener los recuentos en el mismo logaritmo y por debajo del valor de los otros dos productos durante los últimos 15 días de almacenamiento.

4.3.8 Conclusiones

En los primeros ensayos se probó el efecto inhibitorio que ejercía el Permeado de Suero frente al crecimiento de un hongo filamentoso, *Aspergillus parasiticus* CMUNLP7 mediante métodos de inhibición en placa. La utilización de SLC PSFG en concentraciones inferiores al 65% v/v en el medio de cultivo sólido causó una inhibición fúngica expresada en el incremento de la fase de latencia de *A. parasiticus* CMUNLP7 con respecto a los controles que no contenían este producto fermentado. La concentración del 65% de SLC PSFG v/v tuvo carácter fungicida sobre dicho hongo. El SLC PSFG presenta un marcado efecto antifúngico cuando es utilizado en altas concentraciones inhibiendo totalmente el crecimiento de *A. parasiticus* CMUNLP7.

Si bien el producto fermentado ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de hongos filamentosos, el agregado de SLC PSFG en los diferentes medios de cultivo estimuló la producción de aflatoxina B₁ comparado con control de medio MEA sin suplementar. *A. parasiticus* CMUNLP7 es un hongo productor de AFB₁ y la concentración de aflatoxinas producidas no se relaciona proporcionalmente con la cantidad de SLC PSFG adicionado. Al evaluar tratamientos con distintas mezclas de ácidos orgánicos se concluyó que los ácidos orgánicos inhiben *A. parasiticus* CMUNLP7 en medio sólido hasta una mínima concentración de 19,05 mM AA: 55,55 mM AL (48,83 mM de ácidos no disociados totales) y la concentración del ácido láctico tuvo la mayor influencia en el aumento en la producción de aflatoxina B₁.

La adición de PSFG al alimento para pollos seguido de una contaminación artificial con conidios de *A. parasiticus* CMUNLP7 sólo produjo un retraso significativo en la aparición visible del hongo, adicionando PSFG al 100% v/p. La producción de aflatoxina B₁ en el alimento contaminado artificialmente fue detectada solamente en el alimento adicionado con la máxima concentración de PSFG (100% v/v). Esto sugiere que altas concentraciones de PSFG estimulan la síntesis de la micotoxina por parte del hongo salvo que estas sean fungicidas.

4.4 Interacción de los microorganismos del kefir con aflatoxina B₁ (AFB₁).

La enfermedad resultante de la exposición a las micotoxinas se denomina micotoxicosis (CAST, 2003). Las aflatoxinas producen aflatoxicosis siendo producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus*, principalmente. La contaminación de alimentos con *A. flavus* fue descubierta por primera vez como consecuencia de un brote que produjo una muerte súbita de cientos de pavos en el año 1960 y fue denominada enfermedad X de los pavos o “Turkey X Disease” (Blount, 1961). Este hallazgo produjo el aislamiento de un compuesto fluorescente denominado aflatoxina debido a la abreviatura de toxina de “*Aspergillus flavus toxin*” (Nesbitt y col., 1962).

Las principales aflatoxinas son la aflatoxina B₁ y B₂ (AFB₁, AFB₂) por su color azul (blue) y G₁ y G₂ (AFG₁, AFG₂) por su fluorescencia verde (green) al de ser corridas en una placa cromatográfica. La aflatoxina B₁ es la más tóxica y presenta mayor prevalencia, seguida por G₁, B₂ y G₂, que presentan un incremento de la toxicidad en ese orden (Busby, 1984).

La contaminación de los alimentos con estos hongos y aflatoxinas ha sido detectada más frecuentemente en África y sureste de Asia. Los alimentos más frecuentemente contaminados con aflatoxinas son maíz y derivados, maní, frutas secas y productos lácteos (IARC, 1993). En el caso de las aflatoxinas, a sus efectos hepatotóxicos y hepatocancerígenos se añaden el efecto inmunodepresor, aumentando la susceptibilidad a enfermedades de origen viral y bacteriano (Richard y col., 2003; Presello y Botta, 2004).

Existe evidencia epidemiológica que indica que las aflatoxinas son productoras de enfermedades en seres humanos en diversas regiones del mundo. Al respecto, los estudios epidemiológicos en África y Asia Oriental han demostrado una correlación positiva entre el logaritmo de ingestión de alimentos contaminados con aflatoxina B₁ y la ocurrencia de cáncer primario de hígado en humanos (Álvarez y col., 2000). En América Latina se registra el cáncer de hígado en el cuarto lugar de muerte por cáncer, sin estar asociado a altas tasas de hepatitis B, cirrosis u otras enfermedades hepáticas, lo cual deja entre las causas posibles el efecto de las aflatoxinas. A pesar de que más del 60% se registra como cáncer de hígado no especificado como primario ni como secundario, con frecuencia el cáncer secundario por metástasis se diagnostica y luego se registra como primario, cuando

en realidad se trata de lesiones malignas producto de una lesión de origen no determinado o de diagnóstico tardío (Gallardo y Rodríguez, 1999).

Existe evidencia indicando que la exposición crónica a aflatoxinas induce la producción de células cancerígenas, convirtiéndolo en un problema de salud pública, especialmente cuando se asegura que del 20 al 50% de todos los cánceres están relacionados con factores de la dieta (Montesano, 1997; Groopman y col., 1992). La aflatoxina B₁, junto al virus de la hepatitis B, son considerados como los factores de riesgo de cáncer hepatocelular en China y África del Norte, estimándose en 250.000 muertes anualmente (Eaton y Groopman, 1994). En la exposición crónica el efecto más drástico ocurre en el ADN y su efecto se puede subdividir en carcinogénico, mutagénico y teratogénico.

La aflatoxina M₁ (AFM₁) es un metabolito derivado de AFB₁ (4 hidroxil-aflatoxina B₁) (Carnaghan y col., 1963) y que proviene del metabolismo de algunos animales (Creppy, 2002). En los rumiantes que ingieren alimento contaminado con AFB₁, una parte de la AFB₁ es degradada en el rumen por el fluido ruminal y se forma el metabolito aflatoxicol que es 18 veces menos tóxico que la AFB₁ pero es reversible y puede nuevamente transformarse en AFB₁. El aflatoxicol es el reservorio para la génesis de la AFB₁ y es considerado peligroso. La fracción de AFB₁ remanente es absorbida en el tracto digestivo y por difusión pasiva es hidroxilada en el hígado, formándose AFM₁ y contaminando la leche a través del sistema circulatorio sanguíneo. En los mamíferos monogástricos productores de leche (humanos, cerdos y otros), la AFB₁ es absorbida vía tracto gastrointestinal, dentro del sistema portal sanguíneo y es llevada para el hígado donde se metaboliza. Una porción de aflatoxina es activada y fijada en los tejidos hepáticos. Algunos metabolitos conjugados de la AFB₁ solubles en agua son excretados dentro de la bilis y van a las heces. Otras formas conjugadas solubles en agua, productos de degradación de la AFB₁ y metabolitos no conjugados de ésta, son excretadas en el sistema circulatorio sanguíneo y se distribuyen de forma sistémica. Eventualmente, van a la leche y músculo. La AFM₁ es uno de esos derivados metabólicos que va a la leche contaminándola (Gimeno, 2013). Por todo lo mencionado previamente sobre los peligros de la AFB₁ sobre la salud pública se quiso determinar si el uso de la comunidad entera de microorganismos del gránulo de kefir posee la capacidad de capturar aflatoxinas. Si esta hipótesis se comprobara se podría proponer el consumo de kefir para disminuir la absorción intestinal de aflatoxinas ingeridas

con los alimentos. Para cumplir este objetivo se decidió tomar como base el trabajo de León (2013), para corroborar y profundizar los resultados allí obtenidos. Esta investigadora, en sus resultados preliminares encontró que algunos microorganismos del kefir poseían capacidad de captura de AFB₁. Sin embargo era necesario comprobar dichos resultados y compararlos con la capacidad de captura del conjunto de microorganismos del kefir presentes en los productos fermentados con gránulos, que son los que realmente se consumen.

4.4.1 Determinación de la capacidad de captura de AFB₁ por el conjunto de microorganismos presentes en Permeado de Suero (PS) fermentado con gránulos de kefir CIDCA AGK1.

El PS fermentado con gránulos de kefir CIDCA AGK1 a pH final de 3,6 se preparó tal como se describió en materiales y métodos, obteniéndose el pellet de microorganismos totales, los cuales se desafiaron en PBS con una concentración final de 150 ppb de AFB₁. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.4.1.

Tabla 4.4.1 Porcentaje de captura de los microorganismos totales del kefir cultivados en PS resuspendido al 5%.

pH final del PS fermentado	BAL (UFC/ml)	Levaduras (UFC/ml)	Captura (%)
3,6	5,13±0,56x10 ⁸	3,36±0,74x10 ⁷	70,34±6,23

Se obtuvo el PSFG con gránulos CIDCA AGK1 como se indicó en materiales y métodos y se determinó el pH y la concentración de BAL (bacterias ácido-lácticas) y levaduras. Los microorganismos presentes en el PS se desafiaron con la AFB₁ y se determinó la concentración de AFB₁ por HPLC antes y después del desafío en el sobrenadante, previa centrifugación. La metodología se describió en detalle en materiales y métodos. Se calculó la concentración de captura según se indicó en materiales y métodos.

Los microorganismos del kefir entero presentaron un alto porcentaje de captura del 70,34%. Este dato fue corroborado en distintos experimentos donde se observó un porcentaje de

captura del orden del 65-70%. Esto muestra el poder de captura de la comunidad microbiana presente en los productos fermentados con gránulos de kefir. Este efecto es de relevancia ya que los microorganismos totales del producto fermentado son los que están presentes en el producto consumible.

Es importante destacar que esta comunidad microbiana es muy compleja, ya que contiene bacterias ácido-lácticas, bacterias ácido-acéticas, levaduras, hongos en forma mayoritaria y probablemente otros grupos de microorganismos aún no identificados. Esta característica puede significar una ventaja porque distintos microorganismos podrían tener diferente capacidad de captura y su acción sería aditiva, incrementado así el poder de captura total. Sin embargo si se quisiera profundizar en el mecanismo de captura y dilucidar que grupos de microorganismos poseen la mayor capacidad nos encontraríamos frente a un problema, ya que como se indico anteriormente, no se conoce la totalidad de las especies microbianas presentes en el gránulo.

Ya se ha demostrado (Kendirci y Altug, 2004) que en leche contaminada artificialmente con tres concentraciones de aflatoxina M₁ (0,1, 0,2 y 0,5 ppb), y fermentada con gránulos de kefir se produce una disminución en la concentración de micotoxina. En efecto, la proporción de AFM₁ que quedó en el kefir fue de 60, 60 y 80% con respecto a las concentraciones originales de 0,1, 0,2 y 0,5 ppb, respectivamente, mientras que el porcentaje final en el gránulo fue de 1,6, 2,6 y 2,6%. Comparando esos resultados con los obtenidos en este trabajo de tesis podemos observar que: la cantidad de aflatoxina remanente después de un desafío de media hora (alrededor del 30%) fue mucho menor que la obtenida por Kendirci y Altug (2004). Esta diferencia es todavía mayor si se tiene en cuenta que la concentración de aflatoxina de los autores mencionados es aproximadamente 1000 veces menor y que el tiempo de contacto de la aflatoxina con los microorganismos es 40 veces mayor. Esto significa que la eficiencia de la captura en las condiciones que estos autores proponen es inferior a la que se obtiene en este trabajo. Estas discrepancias podrían deberse a diferencias en la comunidad microbiana debido a la presencia de distintos tipos de microorganismos o a una diferencia en la composición de las paredes microbianas dado que el medio de cultivo de los microorganismos es leche en un caso y permeado de suero

en el otro. Hay que destacar también que en un caso se usó AFM_1 y en el otro AFB_1 , hecho que podría modificar la interacción entre microorganismos y aflatoxina.

A los efectos de completar los estudios de captura se determinó dicha capacidad con microorganismos de kefir desarrollados en PS de diferente procedencia. En la Tabla 4.4.2 se presentan los datos obtenidos.

Tabla 4.4.2 Porcentaje de captura de AFB_1 por los microorganismos totales del kefir cultivados en distintos PS resuspendidos al 5%.

Tipo PS	pH PS fermentado	BAL (UFC/ml)	Levaduras (UFC/ml)	Captura (%)	Porcentaje de captura por Microorganismo
1	3.60	$5,13 \pm 0,56 \times 10^8$	$3,36 \pm 0,74 \times 10^7$	$70,34 \pm 6,23$	$1,29E-7$
2	3,61	$1,16 \pm 0,45 \times 10^8$	$3,05 \pm 0,26 \times 10^7$	$48,37 \pm 4,22$	$3,30E-7$
3	3,80	$5,33 \pm 0,62 \times 10^7$	$4,42 \pm 0,72 \times 10^7$	$40,24 \pm 7,43$	$4,13E-7$

Los datos de captura y recuentos de BAL y levaduras de los microorganismos totales del kefir cultivados en el PS 1 fueron tomados de la Tabla 4.4.1. La composición de los PS se presenta en la Tabla 4.1.1. Los PS 1 y 2 corresponden a los adquiridos a la empresa Ilolay[®] y el PS 3 de la empresa Arla Foods[®].

En los PS presentados en la Tabla 4.4.2, denominados PS 2 y 3, para diferenciarlos del PS mostrado anteriormente (PS 1) (Tabla 4.4.1) se observó que presentaron una menor capacidad de captura que el PS 1. También se observó que en el PS 3 disminuyó un orden logarítmico la concentración de BAL. La concentración de levaduras fue similar en los tres PS (Tabla 4.4.1 y 4.4.2), en el orden de 10^7 UFC/ml. A los fines de poder comparar la capacidad de captura de los distintos PS, se calculó la relación %Captura/Microorganismo del kefir. Mediante ella se puede observar que el PS 3, que tuvo el menor porcentaje de captura ($40,24 \pm 7,43$) de los PS probados, tuvo un relación Captura/Microorganismo más alta ($4,13E-7$) que los otros dos ($1,29E-7$ y $3,30E-7$ para el PSFG obtenidos del PS 1 y 2, respectivamente). Es decir, los microorganismos totales obtenidos del PS 3 mostraron la mejor capacidad de capturar AFB_1 , considerando el número de microorganismos presentes en el PSFG.

4.4.2 Determinación de la capacidad de captura de AFB₁ por microorganismos aislados del gránulo de kefir.

Teniendo en cuenta que el conjunto de los microorganismos del kefir tiene la capacidad de secuestrar AFB₁ se realizaron experimentos con microorganismos aislados para determinar si esta propiedad dependía del tipo de microorganismo y si se podían detectar microorganismos específicos con alta capacidad de captura.

4.4.2.1 Captura de aflatoxina B₁ por lactobacilos.

Se evaluó la capacidad de capturar aflatoxina B₁ por parte de varios lactobacilos aislados del gránulo de kefir, cultivados en dos medios de cultivo, MRS (Difco[®], Beauvais, Francia) y permeado de suero (PS). En la Tabla 4.4.3 se observan los porcentajes de captura y los recuentos obtenidos para cada lactobacilo. Se observó que el mayor porcentaje de captura de los microorganismos cultivados en ambos medios, lo presentó *L. plantarum* 83114 con un 55,37% y 51,48% para MRS y PS respectivamente.

Los *L. kefiri* en general capturaron menos aflatoxina que los *L. plantarum* y también presentaron mayor variación entre sí. Además, los *L. kefiri* probados no tuvieron la capacidad de crecer en PS en las condiciones ensayadas. Se observó también que los recuentos de un mismo microorganismo en los dos medios no presentaron variación para *L. plantarum* 83114 y 8316 mientras que descendieron un logaritmo en PS para *L. plantarum* 8327 y 8318.

Tabla 4.4.3 Porcentajes de captura de AFB₁ por lactobacilos aislados de gránulos de kefir.

Lactobacilo	Captura (%)	Recuento (UFC/ml)	C/M: Porcentaje de captura por Microorganismo
<i>L.kefiri</i> JCM ^a 5818 (MRS)	18,34 ± 4,18	1,90 ± 0,39x10 ¹⁰	9,65E-10
<i>L. kefiri</i> CIDCA 83111 (MRS)	5,65 ± 6,44	1,30 ± 0,25x10 ⁹	4,35E-9
<i>L. kefiri</i> CIDCA 8325 (MRS)	34,15 ± 5,89	1,00 ± 0,43x10 ⁹	3,42E-8
<i>L. kefiri</i> CIDCA 8348 (MRS)	16,58 ± 3,77	2,10 ± 0,65x10 ⁹	7,90E-9
<i>L. plantarum</i> CIDCA 83114 (MRS)	55,37 ± 3,19	2,00 ± 0,20x10 ⁹	2,77E-8
<i>L. plantarum</i> CIDCA 83114 (PS)	51,48 ± 5,69	1,35 ± 0,11x10 ⁹	3,81E-8
<i>L. plantarum</i> CIDCA 8318 (MRS)	36,35 ± 4,15	1,76 ± 0,49x10 ¹⁰	2,07E-9
<i>L. plantarum</i> CIDCA 8318 (PS)	33,45 ± 5,76	1,95 ± 0,48x10 ⁹	1,72E-8
<i>L. plantarum</i> CIDCA 8316 (MRS)	39,97 ± 6,02	1,42 ± 0,74x10 ⁹	2,81E-8
<i>L. plantarum</i> CIDCA 8316 (PS)	41,97 ± 4,94	1,00 ± 0,21x10 ⁹	4,20E-8
<i>L. plantarum</i> CIDCA 8327 (MRS)	44,51 ± 2,81	2,85 ± 0,79x10 ¹⁰	1,56E-9
<i>L. plantarum</i> CIDCA 8327 (PS)	46,78 ± 5,78	2,00 ± 0,15x10 ⁹	2,34E-8

Entre paréntesis se indica el medio en el cual se cultivó el lactobacilo.

^aPertenece a la colección JCM (Japan Collection of Microorganisms).

La capacidad de captura de los microorganismos aislados desarrollados en diferentes medios de cultivo mostró diferencias significativas, particularmente las cuatro cepas de *L. plantarum* crecidas en PS mostraron una mayor capacidad de captura que cuando fueron cultivadas en caldo MRS (Figura 4.4.1).

Todos los microorganismos cultivados en ambos medios, capturaron AFB₁ en diferentes porcentajes, pero los lactobacilos que tuvieron la capacidad de crecer en PS fueron los más

eficaces, según quedo demostrado mediante el cálculo de la capacidad de captura AFB₁ por microorganismo.

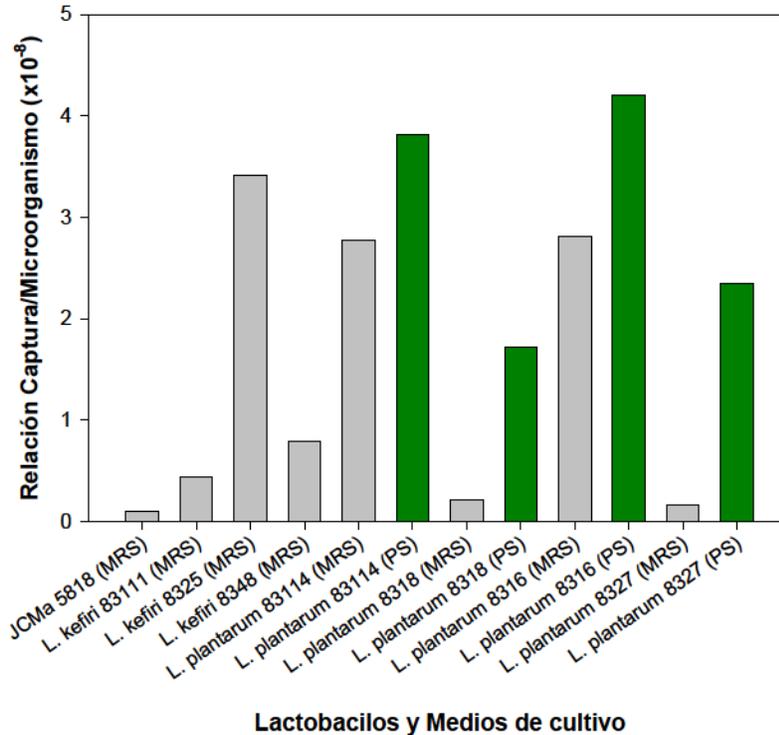


Figura 4.4.1 Porcentaje de captura de aflatoxina B₁ por lactobacilo en función del medio de cultivo. En gris y en verde se indican los porcentajes de captura obtenidos con los lactobacilos cultivados en caldo MRS y en PS, respectivamente. Los datos se tomaron de la Tabla 4.4.2.

Como ya se indicó, *L. plantarum* CIDCA 83114 tuvo una buena capacidad de captura, de 3,81E-8. Este microorganismo presenta otras características positivas en la inhibición fúngica. *L. plantarum* CIDCA 83114 presentó buenos porcentajes de reducción de la germinación, superiores al 90%, sobre *A. flavus* AFUNL5 y *A. parasiticus* NRRL 2999. Estos resultados de inhibición también fueron encontrados por otros investigadores (León, 2013).

Por otra parte, esta cepa de *L. plantarum* es capaz de transformar el sustrato en que crece, reduciendo el porcentaje de lactosa de 3,32% en el permeado estéril hasta 2,62%; produce altas concentraciones de ácido, dado que cuando se incubó a 30°C por 24 horas, acidificó el

PS a un pH de 3,5 con una concentración de ácido láctico y acético de 0,97% y 0,16%, respectivamente, tal como se indicó en la sección 4.1.

En vista de lo anterior, esta cepa presenta un conjunto de propiedades probióticas que determinarían su potencial aplicación industrial. Teniendo esto en cuenta, se decidió seleccionar *L. plantarum* CIDCA 83114 para efectuar los estudios posteriores de captura de AFB₁.

4.4.2.2 Captura de aflatoxina B₁ por parte de levaduras.

En la Tabla 4.4.4 y en la Figura 4.4.2 se pueden observar los resultados de la captura de AFB₁ con levaduras aisladas del kefir y otras aisladas de otros productos fermentados cuando fueron cultivadas en dos medios diferentes, MRS (Difco[®], Beauvais, Francia) y PS. En primer lugar, debe destacarse que todas las levaduras provenientes de los gránulos de kefir de la colección del CIDCA, secuestraron AFB₁ cuando se cultivaron en ambos medios. Las levaduras provenientes de otros productos fermentados fueron *Kluyveromyces lactis* CINDEFI que demostró capacidad de secuestrar pero no así *Saccharomyces boulardii* CINDEFI. El mayor porcentaje de captura obtenido con levaduras crecidas en MRS y PS respectivamente fueron logrados por *S. cerevisiae* CIDCA 8112 ($51,54 \pm 5,82\%$ y $44,57 \pm 4,33\%$, respectivamente).

En la Figura 4.4.2 se observa un gráfico de barras donde se compara la capacidad de captura por levadura crecida en ambos medios de cultivo. Puede observarse que dos comportamientos diferentes en las cepas probadas. Por una parte, las cepas de *K. marxianus* CIDCA 8154, *S. cerevisiae* CIDCA 8116 y *S. cerevisiae* CIDCA 8112 presentaron menor capacidad de captura por microorganismo cuando estas fueron cultivadas en PS. Por el contrario, las cepas de *K. lactis* CINDEFI y *S. cerevisiae* CIDCA 81103 presentaron mayor capacidad de captura en el PS como medio de crecimiento.

Tabla 4.4.4 Porcentajes de captura de aflatoxina B₁ por levaduras aisladas del kefir y de otros productos lácteos fermentados.

Levadura	Captura (%)	Recuento (UFC/ml)	C/M: Porcentaje de captura por Microorganismo
<i>K. marxianus</i> CIDCA 8154 (MRS)	21,65 ± 3,46	1,14 ± 0,64x10 ⁷	1,90E-6
<i>K. marxianus</i> CIDCA 8154 (PS)	31,54 ± 3,37	1,48 ± 0,52x10 ⁸	2,13E-7
<i>S. cerevisiae</i> CIDCA 8116 (MRS)	31,22 ± 2,14	1,10 ± 0,34x10 ⁷	2,84E-6
<i>S. cerevisiae</i> CIDCA 8116 (PS)	43,84 ± 4,84	1,00 ± 0,85x10 ⁸	4,38E-7
<i>S. cerevisiae</i> CIDCA 8112 (MRS)	51,54 ± 5,82	1,11 ± 0,70x10 ⁸	4,64E-7
<i>S. cerevisiae</i> CIDCA 8112 (PS)	44,57 ± 4,33	9,26 ± 0,25x10 ⁸	4,81E-8
<i>S. cerevisiae</i> CIDCA 81103 (MRS)	29,77 ± 3,27	1,21 ± 0,31x10 ⁸	2,46E-7
<i>S. cerevisiae</i> CIDCA 81103 (PS)	39,74 ± 5,02	1,94 ± 0,43x10 ⁷	2,05E-6
<i>K. lactis</i> CINDEFI (MRS)	20,24 ± 4,24	1,00 ± 0,34x10 ⁸	2,00E-7
<i>K. lactis</i> CINDEFI (PS)	28,41 ± 3,17	1,22 ± 0,26x10 ⁷	2,33E-6
<i>S. boulardii</i> CINDEFI (MRS)	0	1,41 ± 0,46x10 ⁷	0

Entre paréntesis se indica el medio en el cual se cultivó la levadura.

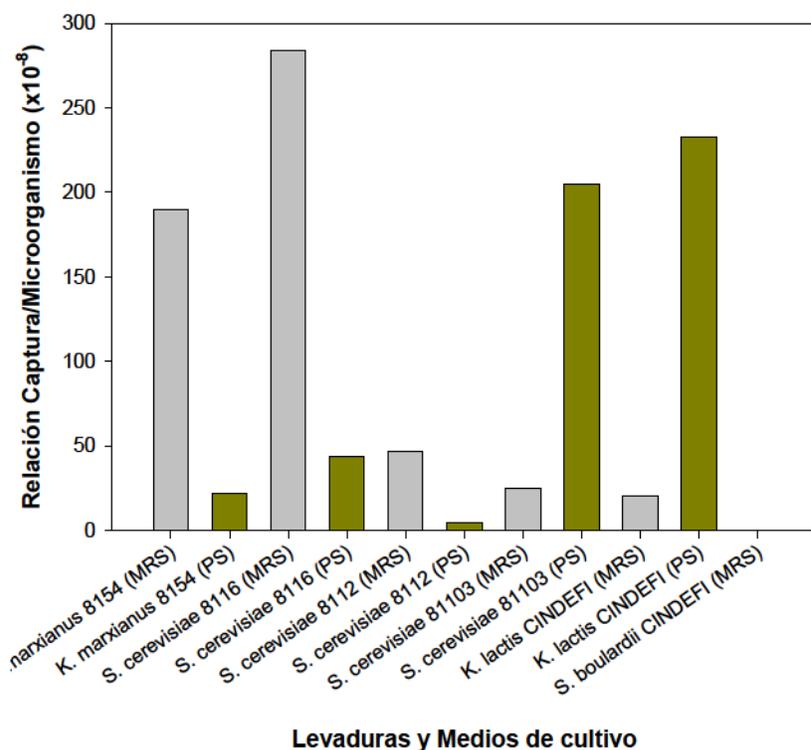


Figura 4.4.2 Porcentaje de captura de AFB₁ por levaduras aisladas de gránulos de kefir y de colección. En gris y oliva se indican los porcentajes de captura por microorganismo obtenidos con las levaduras cultivadas en caldo MRS y en PS respectivamente. Los datos se tomaron de la tabla 4.4.3.

En la Tabla 4.4.3 puede observarse que *K. marxianus* CIDCA 8154 presentó un porcentaje de captura de AFB₁ de $21,65 \pm 3,46\%$ (con un recuento de 10^7 UFC/ml) cultivada en MRS y de $31,54 \pm 3,37\%$ (con un recuento de 10^8 UFC/ml) cultivada en PS al 5%. Aún cuando no presentó el mayor porcentaje de captura, esta levadura ha demostrado características interesantes como una gran capacidad de reducir la lactosa presente en el PS, durante 24 horas de fermentación a 30 °C, pasando de una concentración inicial de 3,32% de lactosa en el PS sin fermentar a 1,01% al final de la fermentación a un pH de 5,06, (sección 4.1), lo cual le hace un microorganismo de interés para elaborar una mezcla microbiana con el *L. plantarum* CIDCA 83114 que fermenten un producto lácteo, tengan actividad antifúngica y capturen AFB₁.

Se tomaron los datos de captura por microorganismo de las Tablas 4.4.2, 4.4.3 4.4.4, y se realizó la Figura 4.4.3 para poder comparar los datos entre ellos.

En esta Figura puede observarse que todas las levaduras (excepto la cepa de *S. boulardii* CINDEFI, que no presentó capacidad de capturar AFB₁) tuvieron una mayor capacidad de captura que los lactobacilos. Esto puede deberse a que las levaduras son más grandes que los lactobacilos y tiene una mayor superficie disponible para la captación de AFB₁. Por otra parte, si comparamos la capacidad de captura de las levaduras con la de los microorganismos totales del kefir (donde hay presentes lactobacilos y levaduras, entre otros grupos de microorganismos) se observa que las levaduras aisladas fueron más eficientes para captar toxina que la mezcla de microorganismos presentes en el kefir.

Si comparamos la capacidad de captura por microorganismo de las levaduras aisladas del kefir crecidas en PS con los microorganismos totales del kefir se pudo observar que la cepa *K. marxianus* CIDCA 8154 (2,13E-7) y *S. cerevisiae* CIDCA 8116 (4,38E-7) presentaron una capacidad de captura similar a la de los microorganismos totales del kefir (entre 1,29 – 4,13E-7). Por otra parte, *S. cerevisiae* CIDCA 8112 presentó una captura de aproximadamente 10 veces menor (4,81E-8) que los microorganismos totales del kefir. Por último, *S. cerevisiae* CIDCA 81103 captó alrededor de 10 veces más AFB₁ (2,05E-6) que los microorganismos totales del kefir.

Esto puede deberse a fenómenos como la coagregación de los microorganismos, que llevaría a disminución la superficie disponible para la captura. También habría que tener en cuenta la concentración relativa de cada cepa en los productos fermentados con kefir.

Por otra parte, si comparamos el porcentaje de captura por microorganismo obtenida con la cepa *L. plantarum* CIDCA 83114, ésta fue una de las más altas para los lactobacilos, pero si se compara con las obtenidas con los microorganismos totales del kefir cultivadas en PS, podemos ver que los microorganismos totales tuvieron mayor capacidad de captura de AFB₁. Se observa que la capacidad de captura de los microorganismos totales del kefir es, al menos, 10 veces mayor que la de los lactobacilos (Figura 4.4.4).

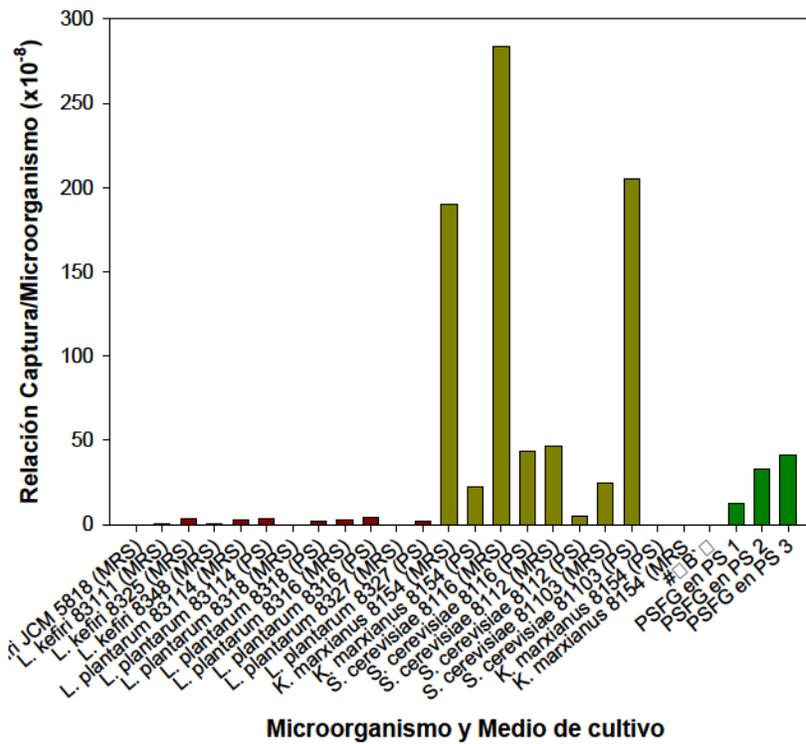


Figura 4.4.3 Comparación entre el porcentaje de captura de AFB₁ por microorganismo realizado por cepas de lactobacilos y levaduras aisladas y por los microorganismos totales del kefir. Los datos fueron tomados de las Tablas 4.4.2, 4.4.3 4.4.4.

A partir de las condiciones anteriores de captura de AFB₁, el consumo de lactosa y capacidad antifúngica, se seleccionaron *L. plantarum* CIDCA 83114 y *K. marxianus* CIDCA 8154 para profundizar los estudios sobre su capacidad de captura de AFB₁.

4.4.3 Estudio de la influencia del porcentaje de hidrofobicidad superficial en la captura de AFB₁.

Las primeras publicaciones sobre captura de micotoxinas demostraron que las bacterias ácido lácticas y otras bacterias intestinales eran capaces de secuestrar contaminantes de la dieta como las aflatoxinas (El-Nezami y col., 1996; El-Nezami y col., 1998a; Thyagaraja y Hosono, 1994). También se demostró que las bifidobacterias muertas por calor capturaban aflatoxina AFB₁ de forma cepa dependiente (Oatley y col., 2000). Algunas investigaciones realizadas previamente demostraron que la remoción de aflatoxinas envuelve el secuestro

probable a nivel de la pared celular o *Lb. rhammosus* de sus componentes (El-Nezami y col., 1998b; Haskard y col., 2001) y que la eliminación de algunos componentes específicos de la pared celular como carbohidratos y proteínas producen un descenso en la captura de AFB₁ (Haskard y col., 2000).

Dado que la captura de aflatoxina se ha interpretado como dependiente de la composición de la pared celular, (Peltonen y col., 2001; Haskard y col., 2001; Hernández – Mendoza y col., 2009) se decidió evaluar si existe correlación entre la hidrofobicidad superficial determinada por las moléculas presentes en la superficie de los microorganismos y la captura de micotoxinas.

Dado que las aflatoxinas son moléculas ligeramente apolares, se quiso determinar si la hidrofobicidad superficial (%H) de los lactobacilos cultivados en dos medios de cultivo diferentes, ejercía un efecto en la capacidad de captura. Para comprobarlo se cultivaron los lactobacilos en MRS (Difco®, Beauvais, Francia) y PS. Se determinó el porcentaje de hidrofobicidad de los microorganismos y se desafiaron con la AFB₁.

En la Tabla 4.4.5 se relacionó el porcentaje de captura por microorganismo de los lactobacilos con el porcentaje de hidrofobicidad (%H) en hexadecano, al ser cultivados en ambos medios de cultivo.

En esta tabla se observa que *L. plantarum* CIDCA 83114 y *L. plantarum* CIDCA 8316 no presentaron grandes cambios tanto en el porcentaje de hidrofobicidad como en el porcentaje de captura por microorganismo cuando fueron cultivados en caldo MRS o PS. Mientras que con *L. plantarum* CIDCA 8327 y *L. plantarum* CIDCA 8318 se observaron escasos cambios en la hidrofobicidad superficial cuando fueron crecidos en ambos medios de cultivo, pero la capacidad de captura si fue modificada, siendo mayor en los microorganismos crecidos en PS.

Tabla 4.4.5 Porcentaje de captura de AFB₁ por microorganismo y porcentaje de Hidrofobicidad de lactobacilos aislados del kefir.

Lactobacilo	Porcentaje de captura por microorganismo	Hidrofobicidad (%)
<i>L.kefiri</i> JCM 5818 (MRS)	9,65E-10	83,0±1,0
<i>L. kefiri</i> 83111 (MRS)	4,35E-9	80,5±2,5
<i>L. kefiri</i> 8325 (MRS)	3.42E-8	79,0±0,1
<i>L. kefiri</i> 8348 (MRS)	7,90E-9	83,0±2,0
<i>L. plantarum</i> 83114 (MRS)	2,77E-8	1,2±0,8
<i>L. plantarum</i> 83114 (PS)	3,81E-8	0,2±0,1
<i>L. plantarum</i> 8318 (MRS)	2,07E-9	2,0±0,1
<i>L. plantarum</i> 8318 (PS)	1,72E-8	0,8±0,1
<i>L. plantarum</i> 8316 (MRS)	2,81E-8	3,5±0,2
<i>L. plantarum</i> 8316 (PS)	4,20E-8	2,0±0,3
<i>L. plantarum</i> 8327 (MRS)	1,56E-9	1,0±0,1
<i>L. plantarum</i> 8327 (PS)	2,34E-8	1,0±0,1

Los datos de hidrofobicidad de esta Tabla se tomaron de León (2013).

Para facilitar la comprensión, en la Figura 4.4.4 se relaciona el porcentaje de captura por microorganismo de los lactobacilos con el porcentaje de hidrofobicidad al ser cultivados en ambos medios de cultivo. En ella se observan dos tendencias: *L. kefiri* hidrofóbicos y *L. plantarum* hidrofílicos. Los lactobacilos con porcentajes de hidrofobicidad entre 79 y 83%, presentaron un porcentaje de captura variable entre 9,65E-10 y 3.42E-8, y los lactobacilos hidrofílicos con porcentajes de hidrofobicidad inferior a 5% (varió entre 1 y 3,5 y entre

0,23 y 2,03% cultivados en MRS y PS respectivamente), capturaron entre $1,56E-9$ y $4,20E-8$.

Se observó que el porcentaje de captura por microorganismo varió considerablemente entre las diferentes cepas tanto de *L. kefir* como de *L. plantarum*. Además, entre los *L. plantarum* los porcentajes de hidrofobicidad no se modificaron de forma significativa cuando fueron cultivados en ambos medios. Sin embargo, la captura se vio escasamente modificada en los distintos medios para *L. plantarum* CIDCA 83114 (entre $2,77E-8$ y $3,81E-8$) y *L. plantarum* CIDCA 8316 (entre $2,81E-8$ y $4,20E-8$), mientras que se observó aumentada su capacidad de capturar AFB₁ para *L. plantarum* CIDCA 8318 y *L. plantarum* CIDCA 8327 cultivadas en PS.

Es decir, no puede afirmarse que la hidrofobicidad superficial sea una medida que determine la capacidad de captura de AFB₁ por los microorganismos.

Podría pensarse otros factores que estén asociados a la composición de la pared, como la presencia de ácidos teicoicos (Hernández-Mendoza y col., 2009) o la transformación en la estructura de algunas proteínas por tratamientos como calor, que expongan superficies afines a la aflatoxina (Haskard y col., 2001), o la capacidad de crear uniones al peptidoglicano de la pared celular (Lahtinen, y col., 2004).

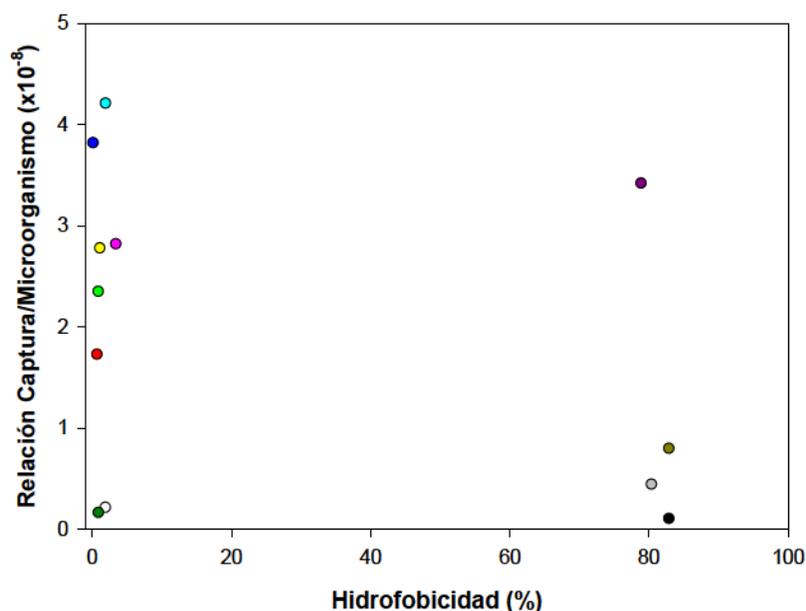


Figura 4.4.4 Relación entre el porcentaje de captura AFB₁ por microorganismo con el porcentaje de Hidrofobicidad de los lactobacilos evaluados. ● *L. kefir* JCM 5818 MRS; ● *L. kefir* 83111 MRS; ● *L. kefir* 8325 MRS; ● *L. kefir* 8348 MRS; ● *L. plantarum* 83114 MRS; ● *L. plantarum* 83114 PS; ● *L. plantarum* 8318 MRS; ● *L. plantarum* 8318 PS; ● *L. plantarum* 8316 MRS; ● *L. plantarum* 8316 PS; ● *L. plantarum* 8327 MRS; ● *L. plantarum* 8327 PS.

En la Tabla 4.4.6 se observa el porcentaje de hidrofobicidad superficial de las levaduras cultivadas en ambos medios de cultivo y el porcentaje de captura de AFB₁ por microorganismo. Se aprecia que al contrario de lo que se observó con los lactobacilos que pudieron crecer en ambos medios, pero no modificaron su hidrofobicidad a pesar de ello. Todas las levaduras alteraron su hidrofobicidad (excepto *K. marxianus* 8154) cuando se desarrollaron en los distintos medios. La capacidad de captura también fue alterada en todos los casos. Específicamente se observó que *K. marxianus* 8154 no modificó su hidrofobicidad superficial en ambos medios pero si redujo su capacidad de captura en PS. Por otra parte, *S. cerevisiae* CIDCA 8116 disminuyó su hidrofobicidad y su capacidad de captura cuando fue cultivada en PS. *S. cerevisiae* CIDCA 8112 incrementó drásticamente su hidrofobicidad pero disminuyó capacidad de captura cuando fue cultivada en PS. Por último, *S. cerevisiae* CIDCA 81103 y *K. lactis* CINDEFI aumentaron su hidrofobicidad y capacidad de captura cuando crecieron en PS.

Tabla 4.4.6 Porcentaje de captura de AFB₁ por microorganismo y porcentaje de Hidrofobicidad de levaduras aisladas del kefir.

Levadura	C/M: Porcentaje de captura por Microorganismo	Hidrofobicidad (%)
<i>K. marxianus</i> CIDCA 8154 (MRS)	1,90E-6	94,92±0,66
<i>K. marxianus</i> CIDCA 8154 (PS)	2,13E-7	94,91±0,59
<i>S. cerevisiae</i> CIDCA 8116 (MRS)	2,84E-6	48,89±8,49
<i>S. cerevisiae</i> CIDCA 8116 (PS)	4,38E-7	27,72±5,22
<i>S. cerevisiae</i> CIDCA 8112 (MRS)	4,64E-7	52,81±8,83
<i>S. cerevisiae</i> CIDCA 8112 (PS)	4,81E-8	89,73±3,73
<i>S. cerevisiae</i> CIDCA 81103 (MRS)	2,46E-7	51,41±3,33
<i>S. cerevisiae</i> CIDCA 81103 (PS)	2,05E-6	95,02±4,35
<i>K. lactis</i> CINDEFI (MRS)	2,00E-7	1,07±0,78
<i>K. lactis</i> CINDEFI (PS)	2,33E-6	31,80±1,35 ^b
<i>S. boulardii</i> CINDEFI (MRS)	0	2,69±0,39

Los datos de hidrofobicidad de esta Tabla se tomaron de León (2013).

Para facilitar la visualización de los resultados obtenidos en la Tabla 4.4.6, se presenta la Figura 4.4.5 donde se representa el porcentaje de captura de AFB₁ por microorganismo de las levaduras en función de su porcentaje de hidrofobicidad superficial.

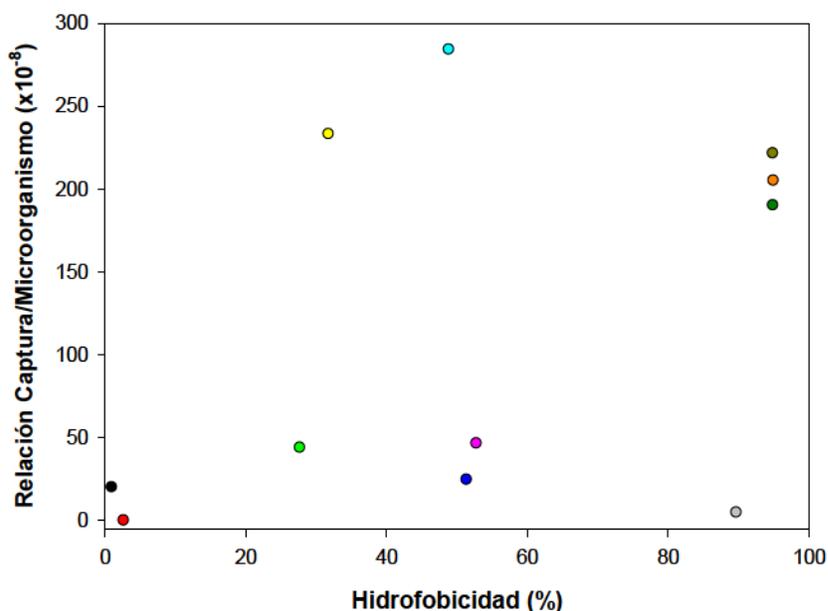


Figura 4.4.5 Relación entre el porcentaje de captura de AFB₁ por microorganismo con el porcentaje de Hidrofobicidad de las levaduras evaluadas. ● *K. marxianus* CIDCA 8154, MRS; ● *K. marxianus* CIDCA 8154, PS; ● *S. cerevisiae* CIDCA 8116, MRS; ● *S. cerevisiae* CIDCA 8116, PS; ● *S. cerevisiae* CIDCA 8112, MRS; ● *S. cerevisiae* CIDCA 8112, PS; ● *S. cerevisiae* CIDCA 81103, MRS; ● *S. cerevisiae* CIDCA 81103, PS; ● *K. lactis* CINDEFI, MRS; ● *K. lactis* CINDEFI, PS; ● *S. boulardii* CINDEFI, MRS.

Por otra parte, los microorganismos totales del kefir cultivados en el PS 1 presentaron un porcentaje de hidrofobicidad superficial de $47,77 \pm 9,32$ (dato obtenido en este trabajo), con una capacidad de captura de AFB₁ por microorganismo de $1,29E-7$ (Tabla 4.4.2).

Los resultados obtenidos permitieron concluir que la hidrofobicidad de las levaduras aisladas del gránulo de kefir varía de acuerdo al medio de cultivo donde son cultivadas, excepto en el caso de *K. marxianus* CIDCA 8154.

Dado que los mismos resultados se encontraron con los lactobacilos cultivados en medio MRS y PS, no se pudo establecer una relación entre el porcentaje de captura y el porcentaje de hidrofobicidad. Estos resultados coincidieron con los obtenidos con *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC-705 y *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS desafiados en PBS con AFB₁, donde no se encontró correlación entre la hidrofobicidad y la afinidad por AFB₁ (Lee y col., 2003).

4.4.4 Captura de aflatoxina B₁ en presencia de microorganismos viables y no viables.

Considerando que los microorganismos seleccionados cumplían con la capacidad de capturar AFB₁, se buscó determinar si es condición necesaria para la captura la presencia de microorganismos vivos, o si aquellos no viables (pasteurizados) conservaban la capacidad de captura presentada por los viables. Para evaluarlo, los cultivos de *L. plantarum* CIDCA 83114 y de *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 cultivados en PS se cosecharon en fase estacionaria, con un recuento de $6,3 \times 10^9 \pm 1,34 \times 10^8$ para *L. plantarum* 83114 y de $1,48 \times 10^8 \pm 5,22 \times 10^7$ para *K. marxianus* 8154 y se sometieron a pasteurización. En paralelo, se realizó el mismo procedimiento con los microorganismos totales y viables obtenidos de la fermentación de los gránulos CIDCA AGK1 que tuvieron un recuento de $8,33 \pm 0,32 \times 10^7$ y $3,72 \pm 0,42 \times 10^7$ de BAL y levaduras, respectivamente. Se comprobó que los microorganismos no eran viables al observar que no hubo crecimiento de las estrías de los microorganismos inoculados en medio sólido (agar MRS y/o YGC). Posteriormente se sometieron al desafío con AFB₁, como se indicó previamente.

La Figura 4.4.6a muestra que la capacidad de captura de *L. plantarum* CIDCA 83114 fue de $54,12 \pm 2,33\%$ para las células viables y de $44,85 \pm 4,24\%$ para las no viables. En el caso de *K. marxianus* CIDCA 8154, las levaduras viables capturaron $21,36 \pm 4,69\%$ y las no viables un $11,25 \pm 4,12\%$. Mientras que cuando se trabajó con los microorganismos totales del kefir viables la captura fue del $67,44 \pm 7,33\%$ y en los no viables fue de $61,21 \pm 5,89\%$, aunque no hubo diferencias estadísticas entre ambos valores. En la Figura 4.4.6b se observa la capacidad de captura por microorganismo con los mismos tratamientos. A través de esta también se observa una pequeña reducción en la capacidad de captura de los microorganismos no viables en relación a los viables. Se aprecia también que los microorganismos totales del kefir, seguidos por *K. marxianus* CIDCA 8154 y, por último, el *L. plantarum* CIDCA 83114 tuvieron mayor capacidad de captura de AFB₁.

A partir de los resultados obtenidos pudo establecerse que la capacidad de captura de AFB₁ por parte de los microorganismos totales no fue afectada por la viabilidad de los mismos, mientras que *L. plantarum* CIDCA 83114 y por *K. marxianus* CIDCA 8154, no se perdió aunque disminuyó alrededor de un 10% para ambos, lo cual podría atribuirse a cambios en

la conformación de la pared y alteración de los sitios de captura debidos a la aplicación de calor.

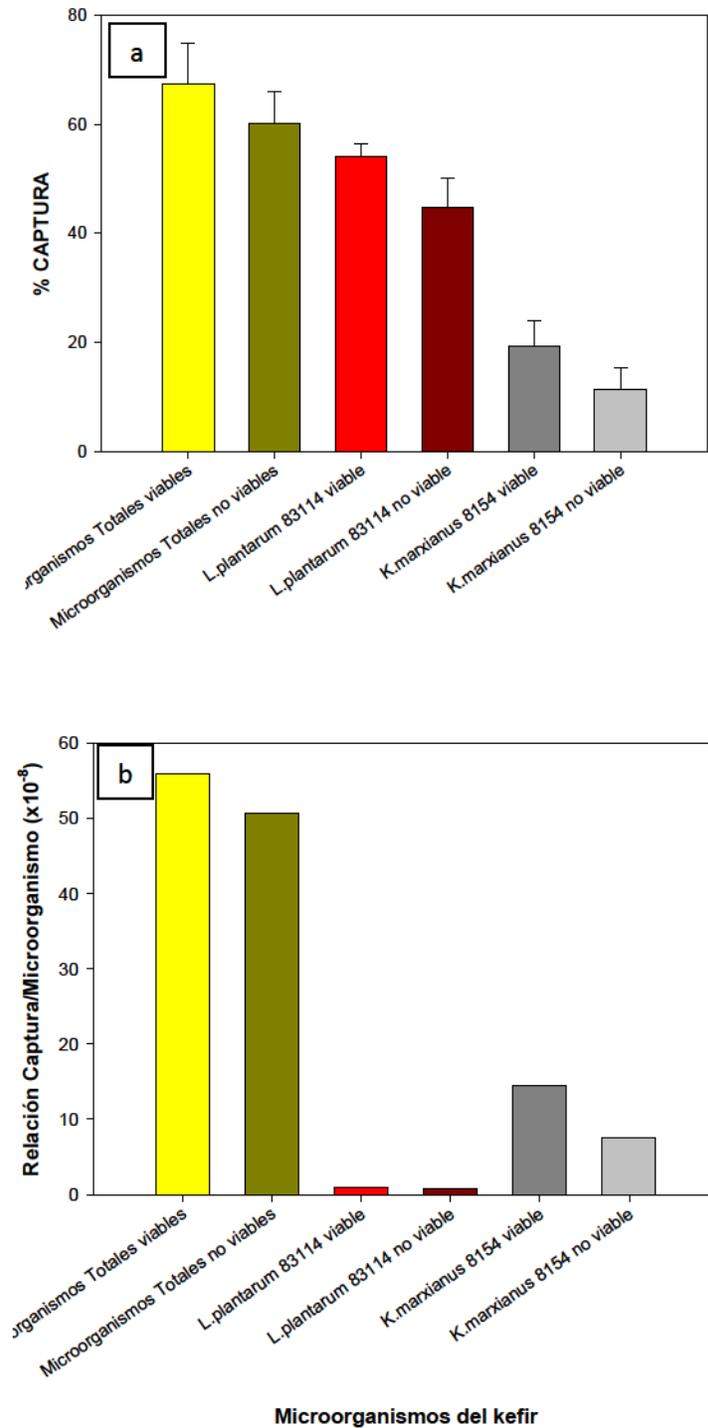


Figura 4.4.6 Porcentaje de captura (a) y porcentaje de captura por microorganismo (b) de AFB₁ por los microorganismos totales del kefir, *L. plantarum* CIDCA 83114 y *K. marxianus* CIDCA 8154 viables y no viables por pasteurización.

A través de diferentes investigaciones previas, se demostró que las BAL tratadas con calor capturaban efectivamente aminoácidos pirolizados (Orrhage y col., 1994; Zhang y Ohta, 1990, 1991, 1993; Thyagaraja y Ozono, 1994) y aflatoxinas (El-Nezami y col., 1998b; Thyagaraja y Ozono, 1994) y que las bifidobacterias muertas por calor capturaban AFB₁ de forma cepa dependiente (Oatley y col., 2000). La remoción de aflatoxinas envuelve el secuestro probable a nivel de la pared celular o de sus componentes (El-Nezami y col., 1998b; Haskard y col., 2001) y el descenso en esta capacidad tal como ocurrió en la presente investigación, puede deberse a la eliminación de algunos componentes específicos de la pared celular tal como se ha demostrado con carbohidratos y proteínas de pared que al ser retirados, produjeron un descenso en la captura de AFB₁ de un lactobacilo como *Lb. rhamnosus* GG (Haskard y col., 2000) y de *L. casei* (Hernández-Mendoza y col., 2009).

Adicionalmente, cabe resaltar que la captura de AFB₁ aun cuando disminuyó, no se perdió debida a la muerte por pasteurización de los microorganismos, lo cual es un elemento positivo para tener en cuenta, ya que así haya muerte microbiana, se conserva gran parte de la capacidad de secuestro de la micotoxina. El hecho de que la capacidad de secuestro de los microorganismos muertos por calor no se pierda totalmente o se reduzca comparado con las células viables, indica que éstas no metabolizan las aflatoxinas. El tratamiento por calor puede cambiar el sitio de captura original del microorganismo viable y/o exponer nuevos sitios de unión al desnaturalizar las proteínas (Haskard y col., 2000). Es por ello que en estudios posteriores se debería estudiar la capacidad de captura de los microorganismos muertos por otros medios como radiación UV, o aplicación de calor más fuerte como esterilización. También se deberá extraer la pared celular y estudiar la capacidad de captura de ésta y de algunos de sus componentes.

4.4.5 Determinación de la capacidad de captura de aflatoxina B₁ por microorganismos totales del gránulo de kefir CIDCA AGK1, *L. plantarum* CIDCA 83114 y *K. marxianus* CIDCA 8154 en solución salina a diferentes pH.

A lo largo del tracto gastrointestinal la presencia de fluidos como el alimento ingerido, el jugo gástrico, el jugo pancreático, las sales biliares y otros, determinan cambios

significativos en el pH. Es así como el pH del estómago, dada la presencia de ácido clorhídrico, puede variar entre 1 y 5 en un período de 24 horas donde el valor mínimo corresponde a los estadios entre comidas y el máximo a la hora de la ingesta de alimentos. En el intestino delgado el pH del quimo aumenta dada la presencia del jugo intestinal (pH 7,6), el jugo pancreático (pH 7,1-8,2) y la bilis (pH 7,6-8,6). En el duodeno, el pH varía entre 5,7 y 6,4; en el yeyuno entre 5,9 y 6,8 y en el Íleon entre 7,3 y 7,7. En el tramo inicial del intestino grueso, el ciego, el pH desciende alrededor de 5,7, debido a la fermentación bacteriana de los carbohidratos que no fueron absorbidos en el intestino delgado, liberando ácidos grasos de cadena corta como propionato, butirato y acetato.

El pH se mantiene levemente ácido tanto en el colon ascendente (5,6) como transversal (5,7) y asciende a 6,6 en el colon descendente y sigmoideo. Por último, el pH del recto varía entre 6,6 a 6,8. (Wilson, 2005). Dado que el encuentro entre los microorganismos y la aflatoxina B₁ puede tener lugar tanto antes como durante la ingesta del alimento, se evaluó la capacidad de captura que presentan los microorganismos del kefir cuando el desafío se realizó directamente a valores de pH del tracto gastrointestinal. Los microorganismos fueron crecidos en PS al 5% y la aflatoxina fue preparada en solución salina (150 ppb) que se llevó a pH 2,1; 5,1; 7,1 y 8,1; el desafío se hizo como se describió anteriormente, por un período de 30 minutos. Al final del desafío, se hicieron los recuentos de los microorganismos presentes a fin de determinar si el cambio brusco de pH alteró su viabilidad. En la Figura 4.4.7 se presentan los porcentajes de captura de AFB₁ por microorganismo obtenidos de los desafíos de los microorganismos totales del gránulo de kefir CIDCA AGK1, por *L. plantarum* 83114 y *K. marxianus* 8154 contra aflatoxina B₁.

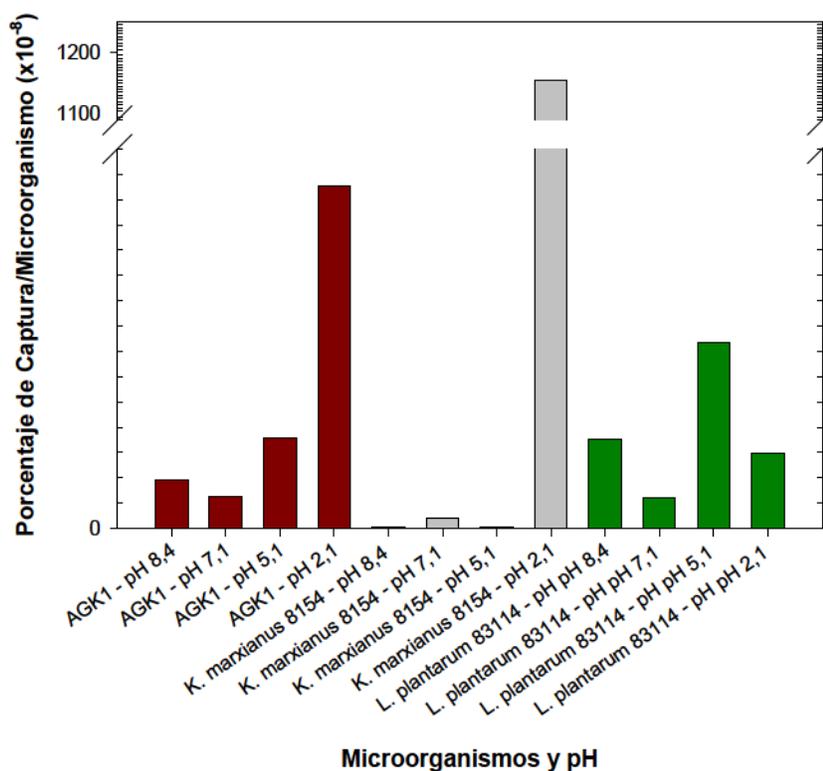


Figura 4.4.7 Porcentaje de captura de AFB₁ por microorganismos totales del gránulo CIDCA AGK1, *L. plantarum* CIDCA 83114 y *K. marxianus* CIDCA 8154, a diferentes valores de pH.

Tanto los microorganismos totales del kefir como los microorganismos individuales no perdieron la capacidad de capturar aflatoxina; sin embargo, ésta varió con los cambios de pH del medio y entre los microorganismos. *K. marxianus* 8154 tuvo su máxima capacidad de captura a pH de 5,1 y la mínima a pH 7,1, mientras que a pH 2,1 y 8,4 presentó menor variación. *L. plantarum* 83114 presentó un comportamiento diferente frente a los diferentes pH. La máxima captura tuvo lugar a pH 2,1 seguido de pH 7,1 mientras que la mínima captura fue a pH 8,4 y 2,1. Lo anterior permite suponer que en la levadura y en la bacteria pudieron ocurrir cambios de conformación en la pared al cambiar el pH, que permitieron la exposición de diferentes sitios de unión a aflatoxinas.

Al parecer, en el caso de la levadura, el pH de 5,1 favoreció la mayor exposición de sitios de unión a AFB₁ que cuando estuvo a pH cerca de la neutralidad (pH 7,1). En el lactobacilo se pudo observar que a pH 8,4 y 5,1 parecía ocurrir la menor exposición de sitios a la

micotoxina y que estos alcanzaron su mayor exposición a pH 2,1. El hecho de que el recuento a pH 7,1 y 5,1 era equivalente pero descendía la captura, indican que la captura no está relacionada con la viabilidad. La disminución en la captura a pH 5,1 puede deberse a un cambio en la conformación de la pared debida al descenso de pH.

Los microorganismos totales provenientes del gránulo de kefir tuvieron la máxima capacidad de captura a pH 2,1 ($1,35e-6$), seguida de la obtenida a pH 5,1 ($3,57e-7$) y 8,4 ($1,91e-7$), mientras que a pH 7,1 presentaron una mínima captura ($1,26e-7$). No obstante, se estableció que sólo hubo diferencia estadísticamente significativa ($P<0,05$) entre los porcentajes de captura obtenidos a pH de 2,1 y 5,1. De allí que el pH óptimo para la captura de aflatoxina B₁ por los microorganismos totales del kefir es 2,1. En cuanto al recuento de microorganismos del gránulo a los diferentes pH, éstos disminuyeron en un orden sólo a pH 2,1. Este descenso no afectó significativamente la capacidad de captura pues fue igual a la obtenida a pH 8, cuyo recuento fue superior; además, aunque su porcentaje de captura fue un poco inferior a la máxima obtenida a pH 7,1, no tuvieron diferencia significativa entre sí.

Se pudo observar una tendencia similar en la variación del porcentaje de captura del kefir y de *L. plantarum* CIDCA 83114, lo que se corresponde con el hecho de que las bacterias lácticas en el kefir prevalecen o están, en general, en una concentración diez veces superior a la de las levaduras, determinando el comportamiento del kefir frente a la captura.

En la Tabla 4.4.7 se presentan los recuentos de todos los microorganismos evaluados a los diferentes valores de pH. Se observó que a pesar de los pH ácidos como en el estómago, los microorganismos no perdieron totalmente su viabilidad. *L. plantarum* CIDCA 83114 tuvo un recuento del orden de 10^9 UFC/ml a pH 8,1, 7,1 y 5,1; mientras que a pH 2,1 el recuento se redujo en 3 órdenes, pero no perdió la capacidad de captura.

Es decir, a este pH su recuento se redujo, pero su capacidad de captura fue similar a la obtenida a pH 8,1, lo cual podría explicarse en que a dicho pH ácido, la conformación de la pared del microorganismo podría ofrecer una cantidad de sitios de unión a la aflatoxina que le permitirían lograr un porcentaje de captura similar al que alcanzó cuando estuvo en un

recuento tres órdenes superiores pero a otro valor de pH donde tal vez no se favorecía tanto la presencia de sitios de unión a AFB₁. Por su parte, *K. marxianus* 8154 tuvo un recuento máximo a pH 7,1 en un orden de 10⁸ UFC/ml, mientras que a los otros pH estuvo un orden por debajo. Su máxima capacidad de captura se dio a pH 5,1 lo cual podría explicarse también por la disposición de sitios de captura a dicho pH.

A pH 8,4 y 7,1 la levadura capturó un porcentaje muy similar de aflatoxina aún cuando existía diferencia en su recuento, la cual no hizo efecto al parecer sobre el secuestro. Por último, aún cuando la levadura tuvo el mismo orden de recuento a pH 2,1 que a pH 8,4, su capacidad de captura fue inferior, evidenciándose que a este pH disminuyeron fuertemente los posibles sitios de unión a la aflatoxina.

Tabla 4.4.7 Recuentos de los microorganismos después del desafío con aflatoxina B₁ a diferentes valores de pH.

Microorganismo	Recuento (UFC/ml)			
	pH 2,1	pH 5,1	pH 7,1	pH 8,4
Microorganismos del gránulo de kefir CIDCA AGK1	BAL 1,12x10 ⁷ ±2,26x10 ⁶	BAL 1,04x10 ⁸ ±9,90x10 ⁶	BAL 5,01x10 ⁸ ±7,78x10 ⁷	BAL 1,22x10 ⁸ ±3,54x10 ⁶
	Levaduras 3,86x10 ⁶ ±3,11x10 ⁵	Levaduras 1,56x10 ⁷ ±4,43x10 ⁶	Levaduras 2,69x10 ⁷ ±9,19x10 ⁶	Levaduras 1,99x10 ⁷ ±5,54x10 ⁶
<i>L. plantarum</i> 83114	2,25x10 ⁶ ±7,07x10 ⁴	5,11x10 ⁹ ±3,32x10 ⁸	1,28x10 ⁹ ±9,38x10 ⁷	5,21x10 ⁹ ±7,21x10 ⁸
<i>K. marxianus</i> 8154	6,83x10 ⁷ ±6,13x10 ⁶	5,43x10 ⁷ ±2,12x10 ⁶	2,28x10 ⁸ ±5,33x10 ⁷	7,63x10 ⁷ ±9,35x10 ⁶

La concentración inicial de los microorganismos fue de 10⁸ UFC/ml y 10⁷ UFC/ml de BAL y LEV para el kefir; 10⁹ UFC/ml de *L. plantarum* 83114 y 10⁸ UFC/ml de *K. marxianus* 8154. Los microorganismos estuvieron expuestos a los pH indicados durante 24 horas.

Previamente, otros autores han estudiado el efecto del pH en la capacidad de secuestrar aflatoxina B₁ y otros compuestos tóxicos y no hay un consenso final sobre este efecto. Algunos investigadores han planteado la importancia de determinar la capacidad de captura de las bacterias al pH del intestino delgado (6-8), dado que este es el punto clave de la digestión donde se inhibe la absorción de la aflatoxina (Haskard y col., 2000). Estos autores demostraron que la capacidad de secuestrar AFB₁ por parte de *L. rhamnosus* GG ya fuera viable o muerto por acidez o por calor, era independiente del pH de la solución en un rango de 2,5 a 8,5, indicando entonces que la formación de puentes de hidrógeno no era

determinante para el secuestro y que éste podría ocurrir en cualquier punto del tracto GI (Haskard y col., 2000).

En contraste con lo anterior y de acuerdo a lo que se pudo determinar en esta investigación, algunos autores han planteado que la captura de compuestos cancerígenos como aminas heterocíclicas formadas durante la cocción de alimentos ricos en proteínas variaba entre diferentes BAL y diferentes valores de pH. *Streptococcus thermophilus* 1131 capturó 85% o más de Trp-P-1 a pH entre 4 y 9 mientras que *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038 capturó el máximo a pH 4 y menos del 50% cuando éste se redujo a 7. (Terahara y col., 1998).

La captura de aflatoxinas y compuestos cancerígenos (aminas heterocíclicas) dependía de las condiciones de pH durante la incubación y dicho efecto fue mayor sobre *Bifidobacterium longum* que sobre *L. acidophilus* (Bolognani y col., 1997). Así mismo se evaluó la capacidad de secuestro de Trp-P-2 por *Streptococcus cremoris* Z-25, directamente en jugo gástrico y se concluyó que ésta variaba con el cambio de pH y fue mayor a pH entre 4 y 8 que a pH ácido de 1,2, 1,48 y 2,1 (Zhang y Ohta, 1991). La captura de AFB₁ a lo largo del tracto gastrointestinal depende del recuento que haya en los diferentes compartimentos del tracto y del estado fisiológico de los microorganismos (Hernández-Mendoza y col., 2009). Dado que el pH del estómago es muy ácido, el recuento de microorganismos en él es muy bajo, usualmente inferior a 10³ UFC por gramo de contenido estomacal. Éste aumenta a 10⁴ en el duodeno hasta alcanzar 10⁷ UFC por gramo de contenido intestinal al final del íleo (Booijink y col., 2007). Otros estudios *in vivo* previos demostraron que al consumir leche fermentada con *L. casei*, el recuento del probiótico en el íleo fue 10 a 100 veces superior a la microbiota residente (Oozeer y col., 2006). Aunque los resultados que se obtuvieron en este estudio, fueron hechos *in vitro*, se demostró que el recuento de *L. plantarum* 83114 descendió hasta 10⁶ a pH estomacal y en el pH cercano al del íleon alcanzó un recuento de 10⁷. *K. marxianus* 8154 tuvo un recuento de 10⁷ en ambos pH. Estos recuentos son superiores a los que han sido indicados en el estómago y son similares a los del íleon de acuerdo a lo indicado por Booijink y col. (2007). Los resultados obtenidos tanto con kefir entero como con los microorganismos aislados, hacen interesante el estudio de estos microorganismos en la captura de AFB₁, ya que demostraron que son

capaces de sobrevivir y capturar aflatoxina cuando el desafío tiene lugar a pH similares a los del tracto digestivo. No obstante, deberán realizarse estudios *in vitro* donde se analice la captura de aflatoxina combinando la variación de pH con la presencia de jugos gástricos, pancreáticos, intestinales y biliares.

4.4.6 Capacidad de captura de aflatoxina B₁ con diferentes concentraciones de *L. plantarum* CIDCA 83114 y *K. marxianus* CIDCA 8154 y de los microorganismos totales del kefir.

Aún cuando en el estudio a diferentes pH se observó que a un pH determinado podía disminuir el recuento microbiano pero conservar o aumentar su capacidad de captura de aflatoxina, se investigó el efecto de la variación de la concentración de los microorganismos en la captura de AFB₁ en PBS y a pH 7,1. En la Figura 4.4.8 se observa el descenso en la captura de AFB₁ cuando disminuye la concentración de *L. plantarum* CIDCA 83114, de *K. marxianus* CIDCA 8154 y de los microorganismos totales del kefir en el medio del desafío, hasta casi no observarse captura a la dilución 1/1000.

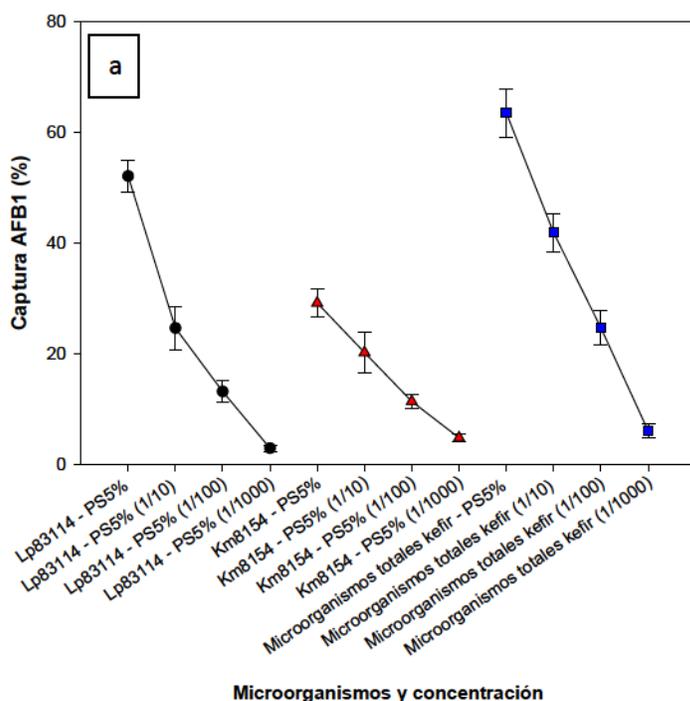


Figura 4.4.8 Porcentaje de captura de AFB₁ por *L. plantarum* CIDCA 83114, *K. marxianus* CIDCA 8154 y microorganismos totales del kefir en diferentes concentraciones de microorganismo.

Los desafíos fueron realizados a 30 °C por 30 minutos. La concentración inicial de *L. plantarum* CIDCA 83114 fue de $1,82 \pm 0,28 \times 10^9$, de *K. marxianus* CIDCA 8154 fue de $2,41 \pm 0,36 \times 10^8$ y de los microorganismos totales del kefir fue de $7,18 \pm 0,44 \times 10^7$ BAL y de $3,37 \pm 0,29 \times 10^7$.

Para el lactobacilo, el porcentaje de captura fue $52,08 \pm 7,45\%$ en la concentración $1,82 \pm 0,276 \times 10^9$ UFC/ml; disminuyó a la mitad ($24,59 \pm 9,86\%$), a la cuarta parte ($13,14 \pm 8,98\%$), y 20 veces ($2,88 \pm 0,61\%$) a medida que su concentración se redujo en 10, 100 y 1000 veces respectivamente.

De igual manera, *K. marxianus* 8154 capturó $29,15 \pm 0,62\%$ en la concentración original de $1,81 \pm 0,36 \times 10^8$ y se redujo en 1,45 ($20,17 \pm 0,59\%$), 2,6 ($20,17 \pm 0,59\%$) y 7,25 ($4,76 \pm 0,59\%$) veces a medida que su concentración disminuyó 10, 100 y 1000 veces respectivamente.

Siguiendo con esta tendencia, cuando se trabajó con los microorganismos totales del kefir el porcentaje de captura fue $63,52 \pm 4,35\%$, para la concentración directa, mientras que

disminuyó alrededor de un tercio ($41,85 \pm 3,42\%$), un 54% ($24,69 \pm 3,03\%$) y un 84% ($9,01 \pm 1,21\%$) a medida que su concentración se redujo en 10, 100 y 1000 veces respectivamente.

A partir de lo anterior se concluyó que el número de microorganismos presentes en el desafío, es determinante en el porcentaje de captura, pues al pH evaluado, se estableció que la captura disminuye proporcionalmente al descenso de concentración microbiana.

Con todos los ensayos anteriores se encontró que los microorganismos totales del kefir, los lactobacilos y levaduras aislados del gránulo de kefir demostraron capacidad de capturar AFB₁ y fue cepa dependiente. Además, la capacidad de secuestrar AFB₁ cambió de acuerdo al medio de cultivo del microorganismo y no tuvo relación con el porcentaje de hidrofobicidad superficial. Por otra parte, tanto los microorganismos totales del kefir como el *L. plantarum* CIDCA 83114 y la *K. marxianus* CIDCA 8154 redujeron pero no perdieron totalmente su capacidad de secuestrar aflatoxina B₁ cuando fueron muertas por calor. Adicionalmente, la variación en el pH del medio del desafío también generó cambios en la capacidad de captura, y los pH de máxima captura fueron variables, para los microorganismos del kefir entero, el lactobacilo y la levadura. Todo esto indica que existe una gran complejidad de factores que intervienen en la interacción microorganismo-AFB₁, y teniendo en cuenta los resultados prometedores en cuanto a la capacidad de captura de AFB₁ por los microorganismos del kefir se decidió estudiar la capacidad protectora de los microorganismos del kefir sobre monocapas celulares expuestas a AFB₁.

4.4.7 Estudio de la capacidad protectora del kefir sobre monocapas celulares expuestas a aflatoxina B₁

4.4.7.1 Capacidad de adhesión de los microorganismos del kefir a las células Caco-2TC7.

Para comenzar estos estudios se determinó la capacidad de adhesión de los microorganismos totales del kefir a células Caco-2TC7 que son un clon de las células Caco-2 (Servin, 2004), las cuales son células de carcinoma de colon humano y se diferencian en enterocitos maduros luego de la confluencia, son células polarizadas con desarrollo del

borde apical “en cepillo” característico de las células intestinales (Pinto y col., 1983; Chantret y col., 1994). Estas líneas son muy utilizadas para estudiar y seleccionar bacterias lácticas en base a su capacidad de adhesión (Pinto y col., 1983; Tuomola y Salminen, 1998).

En la Tabla 4.4.8 se presentan los recuentos de microorganismos del kefir totales y viables iniciales, antes de la adhesión, y luego de ésta (microorganismos adheridos).

Para realizar los experimento con células se obtuvo una suspensión microbiana de $DO_{600NM}=10$ y se determinó el estado fisiológico de los microorganismos del kefir, antes de la adhesión a la monocapa. Allí se observó que el 1% de las bacterias lácticas totales eran viables, correspondiendo a un recuento de $5,2 \pm 0,18 \times 10^7$ UFC/ml. Por el contrario, las levaduras totales y viables estuvieron dentro del mismo orden logarítmico (10^7 UFC/ml). Los recuentos de microorganismos viables estuvieron dentro los límites mínimos exigidos por el Código Alimentario Argentino de 10^7 y 10^4 UFC/ml de BAL y levaduras, respectivamente (CAA, 2006). La reducción en la viabilidad de las bacterias lácticas puede explicarse debido a que son microorganismos exigentes nutricionalmente y los gránulos CIDCA AGK1 fueron crecidos en PS, un efluente de la industria láctea, cuya composición se caracteriza principalmente por la presencia de lactosa (alrededor del 3%) y muy baja concentración de nitrógeno ($\leq 0,02\%$) (Sección 4.1). Luego, la suspensión microbiana de $DO_{600NM}=10$ se adicionó a la monocapa celular diferenciada y se realizaron los recuentos de microorganismos totales y viables como se indicó en los materiales y métodos.

Tabla 4.4.8. Estudio de adhesión de los microorganismos del kefir a las Caco-2TC7

	Inicial ($DO_{600NM}=10$)		Adheridos	
	BAL	Levaduras	BAL	Levaduras
Recuento Totales (microorganismos/ml)	$1,20 \pm 0,77 \times 10^9$	$6,01 \pm 0,52 \times 10^7$	$1,10 \pm 0,78 \times 10^8$	$6,50 \pm 0,51 \times 10^6$
Recuento Viables (UFC/ml)	$5,20 \pm 0,18 \times 10^7$	$1,52 \pm 0,35 \times 10^7$	$3,60 \pm 0,57 \times 10^6$	$3,50 \pm 0,11 \times 10^6$

Se observó que se adhirieron solo el 10% de los microorganismos totales del kefir presentes en la suspensión microbiana en PBS de DO 10. Y de los microorganismos adheridos, el 1%

de las BAL estaban viables mientras que las levaduras adheridas, tanto las totales como las viables fueron del mismo orden logarítmico (10^6 UFC/ml).

Estos resultados fueron similares a los encontrados por Golowczyc (2008), quien estudió la capacidad de algunos microorganismos aislados del kefir como el *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, *L. plantarum* CIDCA 8318, *L. plantarum* CIDCA 8316 y *L. kefir* CIDCA 83111 (todos microorganismos aislados de las gránulos CIDCA AGK1) de adherirse a las células Caco-2TC7, y encontró que estos microorganismos presentaron un porcentaje de adhesión entre el 1 y el 4%, según la cepa evaluada.

4.4.7.2 Estudio del efecto protector de los microorganismos totales del kefir en línea celular Caco-2TC7 expuesta a aflatoxina B₁.

El daño celular causado por xenobióticos como las aflatoxinas da como resultado una alteración de la permeabilidad de membrana celular llevando al vertido hacia el exterior de enzimas citoplasmáticas, entre ellas la LDH es un excelente marcador para evaluar citotoxicidad. El vertido de otras enzimas asociadas a determinadas organelas celulares como la mitocondria, son también utilizados. Entre ellos, el test mitocondrial del MTT, basado en la conversión de sales de tetrazolio en un formazán de color azul por la acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, es ampliamente usado, como se indicó en materiales y métodos.

Se construyeron las curvas de calibración para establecer –mediante las técnicas de la lactato deshidrogenasa (LDH) y de la actividad deshidrogenasa mitocondrial (MTT)- el daño celular causado por diversas concentraciones de AFB₁ sobre la línea celular Caco-2TC7. Mediante la técnica LDH se observó una relación lineal entre la concentración de AFB₁ y el aumento de la actividad enzimática, la cual indica mayor daño celular (Figura 4.4.9a). La técnica MTT no permitió detectar diferencias significativas entre la actividad deshidrogenasa mitocondrial del control y las distintas concentraciones de AFB₁ ensayadas (Figura 4.4.9b). Con base en estos resultados, se decidió continuar el estudio del efecto de la aflatoxina B₁ sobre las células mediante la técnica LDH.

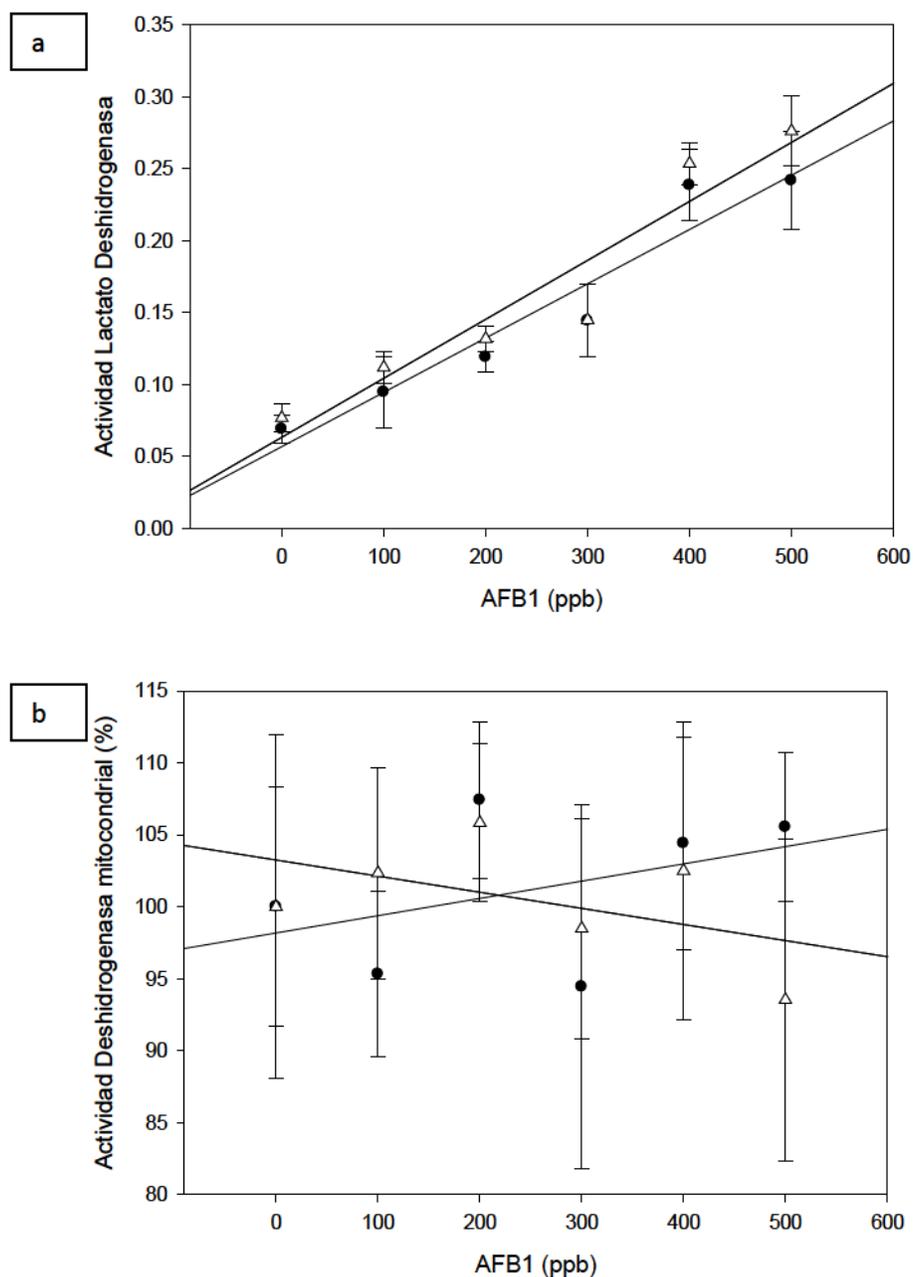


Figura 4.4.9. Curva de calibración del daño celular en la línea Caco-2TC7 vs. Concentración de AFB₁ mediante las técnicas LDH (a) y MTT (b). Los resultados representan la media de los experimentos realizados por cuadruplicado. Cada ensayo se repitió dos veces. ● 1°; △ 2° ensayo.

Para los ensayos de co-incubación con los microorganismos del kefir se decidió trabajar con dos concentraciones de AFB₁ (300 y 500 ppb) debido a que 300 ppb fue la menor

concentración de AFB₁ que tuvo diferencias significativas con el control mientras que la de 500 ppb se conservó como la máxima concentración de trabajo.

4.4.7.3 Efecto en el daño celular por la co-incubación de los microorganismos con aflatoxina B₁ sobre células Caco-2TC7.

Estos ensayos se realizaron de dos maneras: primero, se adicionaron los microorganismos del kefir y la AFB₁ simultáneamente sobre las células en estudio (Ensayo de co-incubación). Por otra parte, cuando se hizo un ensayo donde se estudio la capacidad protectora de los microorganismos del kefir adheridos a la monocapa, las células Caco-2TC7 se enfrentaron previamente con los microorganismos del kefir, se realizaron lavados con PBS para quitar los microorganismos no adheridos, y posteriormente se adicionó la AFB₁ (Ensayo de pre-incubación).

Cuando se agregaron los microorganismos del kefir y las micotoxinas (Ensayo de co-incubación) (Tabla 4.4.9), sin una incubación previa, observamos resultados similares a los obtenidos con los microorganismos que se incubaron previamente (Ensayo de pre-incubación) (Tabla 4.4.9). Es decir que la presencia de los microorganismos adheridos tampoco presentó capacidad protectora sobre la línea celular estudiada.

Tabla 4.4.9 Actividad LDH de células Caco-2TC7 expuestas a aflatoxina B₁ con o sin presencia de microorganismos totales del kefir.

Tratamientos	Actividad LDH*
Control	0,076±0,003 ^a
300 ppb	0,131±0,012 ^b
500 ppb	0,220±0,018 ^c
300 ppb + MO simultáneos	0,130±0,009 ^b
500 ppb + MO simultáneos	0,189±0,015 ^c
300 ppb + MO lavados	0,147±0,005 ^b
500 ppb + MO lavados	0,224±0,009 ^c

*misma letra indica que no hubo diferencias estadísticamente significativas (ANOVA<0.05). El ensayo se realizó por cuadruplicado.

Se observó que hubo un orden logarítmico de diferencia entre los microorganismos del kefir totales presentes en la suspensión en PBS de DO=10 y los microorganismos totales adheridas a las monocapas. Esas concentraciones de microorganismos del kefir (totales y adheridos) no fueron suficientes para reducir la actividad lactato deshidrogenasa en presencia de las concentraciones de micotoxinas estudiadas. En definitiva, no se observó un efecto protector de los microorganismos del kefir en células Caco-2TC7.

Adicionalmente se enfrentaron células Caco-2TC7 de 7 días a agua miliQ estéril por 1 h para producir la lisis celular y producir el volcado de todo el contenido citoplasmático al exterior. Por lo tanto, se liberó todo el contenido de la enzima LDH al exterior. Se tomaron muestras de este y se midió la actividad LDH como se hizo en los casos anteriores. Ese valor se tomó como la máxima actividad LDH en las células Caco-2TC7. Se encontró una actividad LDH de 5,28. Esto sugiere que si bien la AFB₁, en las dos concentraciones ensayadas, produjo aumentos de la actividad LDH, indicando cierto grado de daño sobre las células, este está muy distante al producido por el agua miliQ.

Esto va en concordancia con los estudios que sugieren que la AFB₁ ingresa a las células mediante difusión pasiva debido a que es un metabolito de bajo peso molecular (Hsieh y Wong, 1994; Fernandez y col., 1997) y esto está apoyado sobre estudios realizados sobre células Caco-2 que muestran que existe una tasa de transporte similar desde el lado apical hacia el lado basolateral y viceversa (Mata y col., 2004). Es decir, que las células intestinales, si bien pueden llegar a ser dañadas por AFB₁ (en intoxicaciones agudas) ellas principalmente no se muy afectadas por la rápida absorción de la micotoxina y liberación en el torrente sanguíneo, donde se dirigen al hígado, y ejercen su acción tóxica.

4.4.7.4 Efecto en el daño celular por la co-incubación de aflatoxina B₁ con las células HepG2

Debido a que las células Caco-2TC7 no fueron un buen modelo para el estudio del efecto de las aflatoxinas sobre ellas, se decidió utilizar las células HepG2 como modelo para estudiar la capacidad de protección del kefir frente a la presencia de la AFB₁. Las células HepG2 son células de hepatoma humano usadas como modelos para estudiar la acción

tóxica de xenobióticos sobre las células del hígado (McKean y col., 2006; Chu-Chyn y col., 2012). Cabe notar que este es solo un modelo, no representa lo que ocurriría en nuestro cuerpo debido a que los microorganismos del kefir nunca estarán en contacto directo con estas células en condiciones normales.

Hecha esta aclaración, primero se realizó una curva de calibración con distintas concentraciones de AFB₁ (0; 1; 10; 50; 100; 200; 300; 400 y 500 ppb) frente a las células HepG2 mediante tres métodos (lactato deshidrogenasa (LDH), medición de la actividad deshidrogenasa mitocondrial (MTT) y tinción con ioduro de propidio (IP)).

El daño celular causado por xenobióticos como las aflatoxinas da como resultado una alteración de la permeabilidad de membrana celular llevando al vertido hacia el exterior de enzimas citoplasmáticas, entre ellas la LDH es un excelente marcador para evaluar citotoxicidad. El vertido de otras enzimas asociadas a determinadas organelas celulares como la mitocondria. Entre ellos, el test mitocondrial del MTT, basado en la conversión de sales de tetrazolio en un formazán de color azul por la acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, es ampliamente usado (Mosmann, 1983; Berridge y col., 1996; Hansen y Brünner, 1998; Kakisu, 2010; Merino, 2014), como se mencionó previamente. Por último, el ensayo de tinción con IP, se basa en la penetración de dicho fluorocromo de las células que han perdido cierta integridad en su membrana celular y la coloración de los núcleos de éstas celular de color rojo (Perez, 2013).

En la Figura 4.4.10 se presentan las curvas de calibración de diferentes concentraciones de AFB₁ sobre las células HepG2, mediante test mitocondrial del MTT.

Mediante el estudio de la actividad deshidrogenasa mitocondrial de las células HepG2 expuestas a AFB₁, pudimos determinar la concentración letal 50 (CL₅₀) que es la concentración de AFB₁ necesaria para reducir la viabilidad de las células HepG2 hasta la mitad, con respecto a un control sin presencia de micotoxinas. Estos resultados donde la CL₅₀ se estableció en 294,09 ± 16,15 ppb (equivalente a 0,94 μM) estuvieron en concordancia con los encontrados por McKean y col. (2006), quien determinó una CL₅₀ sobre células HepG2 igual a 1,0 μM.

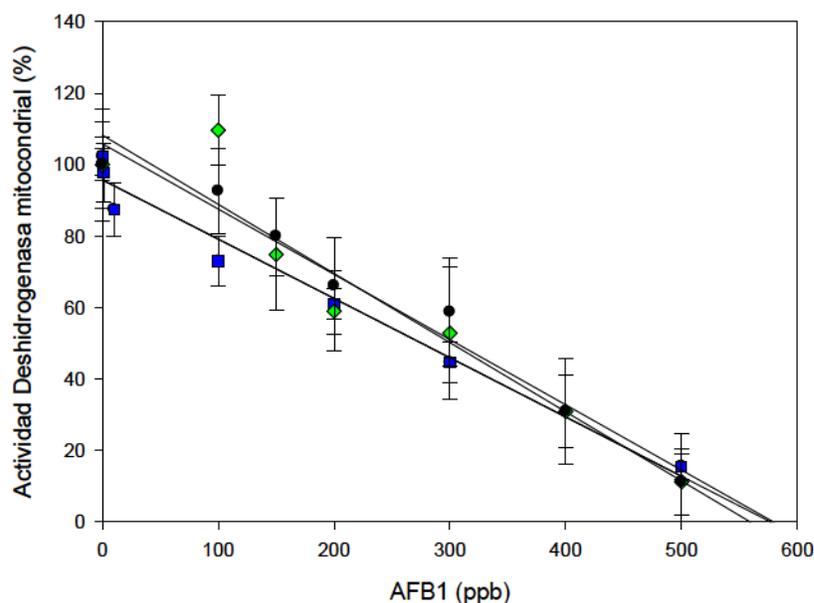


Figura 4.4.10 Determinación de la actividad deshidrogenasa mitocondrial en células HepG2 expuestas a diferentes concentraciones de AFB₁ (entre 0 y 500 ppb).

Con la ecuación de la recta de cada regresión lineal se determinó la CL₅₀. Los resultados responden a tres ensayos independientes, cada uno por quintuplicado. CL₅₀ igual a 294,09 ± 16,15 ppb se obtuvo de un promedio de todos los valores recolectados. Datos tomados de la 1° (●); 2° (■); 3° (◆) curva de calibración.

En la Figura 4.4.11 se observan la tinción con yoduro de propidio de los núcleos de las células HepG2 expuestas a diferentes concentraciones de AFB₁. Este ensayo no arrojó una relación clara. Como era esperable, las células control sin AFB₁ presentaron 7,33 ± 3,79 células/fosa. La presencia de entre 100 y 150 ppb produjo un aumento significativo de la observación de los núcleos necróticos hasta 19,5 ± 2,12 y 18,33 ± 3,51 células/fosa, respectivamente, mostrando claramente el daño causado por la AFB₁. Cuando se adicionó 200 y 300 ppb de AFB₁, el número de núcleos necróticos aumentó nuevamente. Pero al agregar concentraciones mayores de AFB₁ (400 y 500 ppb), se observaron menos células necróticas. Esto se debió posiblemente a que el yoduro de propidio ingresa en las células que han perdido cierta integridad de membrana, pero si el daño es lo suficientemente fuerte para desprender las células de la monocapa, los núcleos de dichas células no se pueden teñir con el fluorocromo. En resumen, concentraciones ≥ 300 ppb de AFB₁ comienza a producirse un daño celular que lleva al desprendimiento de la monocapa. Además, ese valor es muy

cercano al encontrado como la CL_{50} mediante el ensayo de MTT, lo que demuestra que el daño celular es muy significativo.

En conclusión, la tinción con yoduro de propidio, por sí solo, no se lo considero útil como una técnica para estudiar el daño producido por AFB_1 . Pero podría ser de utilidad si se lo complementa con otros ensayos como el del MTT.

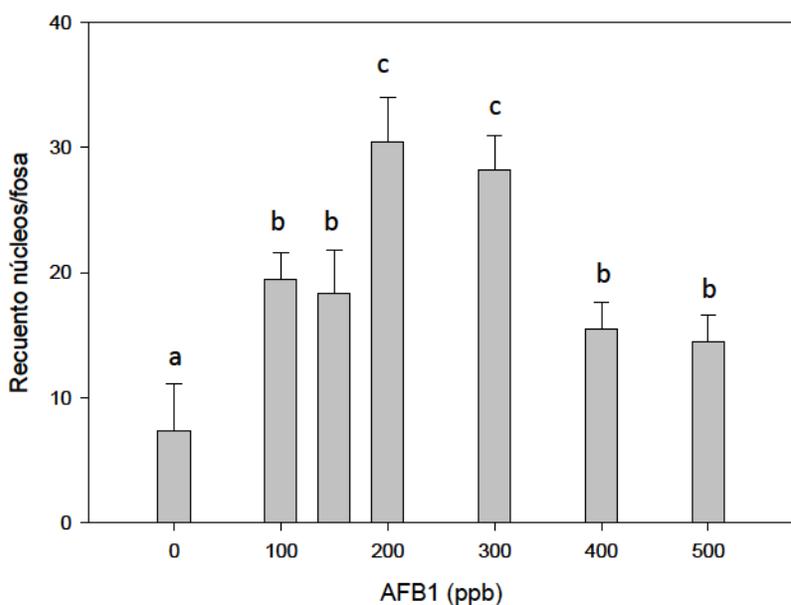


Figura 4.4.11 Determinación de núcleos necróticos mediante tinción con yoduro de propidio en células HepG2 expuestas a diferentes concentraciones de AFB_1 (entre 0 y 500 ppb).

En la Figura 4.4.12 se representan los datos obtenidos al exponer las células HepG2 a diferentes concentraciones de AFB_1 mediante la medición de la actividad LDH. Se observó un aumento progresivo de la actividad LDH a medida que se incrementó la concentración de AFB_1 presente, por lo que se lo considero como un método útil para continuar los estudios.

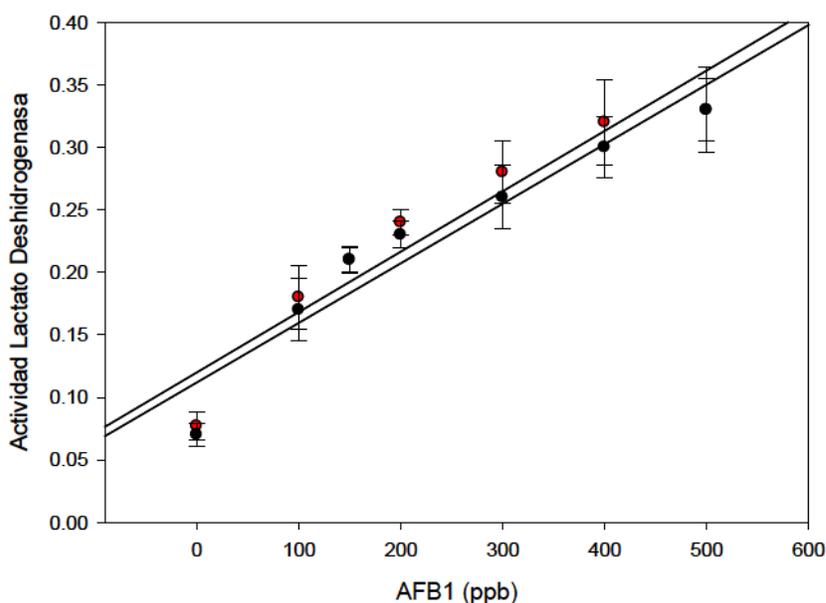


Figura 4.4.12 Determinación de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en células HepG2 expuestas a diferentes concentraciones de AFB₁ (entre 0 y 500 ppb). El ensayo se realizó por cuadruplicado y se repitió dos veces. Datos tomados de la 1° (●); 2° (●) curva de calibración.

Con los datos recolectados, se observó una relación lineal entre la concentración de AFB₁ y el daño producido sobre las células HepG2 mediante la medición de la actividad deshidrogenasa mitocondrial y lactato deshidrogenasa. Por lo tanto, se los considero a ambos métodos útiles para continuar los estudios de la capacidad protectora de los microorganismos del kefir sobre las células HepG2. El ensayo de la medición de la actividad deshidrogenasa mitocondrial (MTT) nos permitió determinar la CL₅₀ (es decir, la concentración de AFB₁ necesaria para reducir la viabilidad de las células HepG2 hasta la mitad, con respecto a un control sin presencia de AFB₁) igual a $294,09 \pm 16,15$ ppb.

4.4.7.5 Efecto en el daño celular por la co-incubación de los microorganismos del kefir con las células HepG2.

Se continuó estudiando el efecto de los microorganismos del kefir, por si solos, sobre las células hepáticas HepG2. Esto se realizó debido a que estas células no están en contacto con microorganismos normalmente, al contrario de lo que ocurre con las células del epitelio

intestinal, esto hace necesario conocer si los microorganismos del kefir dañan las células HepG2.

En la Tabla 4.4.10 se muestran la actividad deshidrogenasa mitocondrial de las células HepG2 en presencia de microorganismos del kefir viables y no viables. Las suspensiones de microorganismos tanto viables como no viables se usaron en las mismas concentraciones que los ensayos de captura de AFB₁ y los ensayos con las células Caco-2TC7 (suspensiones DO=10).

Se encontró que la presencia de los microorganismos vivos del kefir produjo un aumento en la actividad deshidrogenasa mitocondrial debido a la presencia de las levaduras, las cuales tienen un metabolismo energético semejante al de las células hepáticas, por ser ambas células eucarióticas. Estos incrementos fueron significativamente mayores a los controles de células HepG2 sin microorganismos. Esto no se observó cuando los microorganismos del kefir fueron pasteurizados ya que si bien la actividad MTT fue menor en las células con los microorganismos no viables, ésta no tuvo diferencias estadísticas con los controles antes mencionados.

Además, se observó un aumento de la turbidez, cuando se midió la absorbancia a 600_{NM}, lo que indica que hubo crecimiento microbiano, a pesar de la presencia de penicilina, streptomycin y gentamicina en el medio DMEM. Todos estos antibióticos inhibieron las bacterias del kefir presentes pero no así las levaduras. Por otra parte, el pH del medio DMEM fue inmediatamente modificado por la adición de los microorganismos del kefir viables, ese descenso del pH fue menor a medida que aumentaron las diluciones de los microorganismos, tanto a la hora 0 (después de la adición de los microorganismos al medio DMEM) como a las 24 h. En cambio, los microorganismos no viables no produjeron cambios significativos en el pH.

Tabla 4.4.10 Actividad deshidrogenasa mitocondrial, pH y DO_{600NM} de las células HepG2 incubadas con microorganismos totales del kefir.

Tratamientos	MTT	pH inicial (0 h)	pH final (24 h)	DO _{600NM} inicial (0 h)	DO _{600NM} final (24 h)
DMEM Control	100 ± 18,8 ^a	8,08	8,64	0	0
DMEM + MO* viables	134,5 ± 17,75 ^b	7,07	6,87	0,335	0,340
DMEM + MO* viables 1/10	133,9 ± 20,58 ^b	7,84	7,04	0,049	0,156
DMEM + MO* viables 1/100	184,8 ± 26,39 ^c	7,99	7,27	0,001	0,138
DMEM + MO* no viables	87,09 ± 20,69 ^a	8,03	8,17	0,433	0,362
DMEM + MO* no viables 1/10	85,57 ± 21,38 ^a	8,04	8,82	0,043	0,033

*MO: microorganismos totales del kefir

Debido a esto resultados se decidió continuar los estudios con los microorganismos muertos. Esto se apoya también en los resultados obtenidos con los ensayos de captura de AFB₁ por los microorganismos del kefir vivos y muertos, allí observamos que, si bien la capacidad de captura es menor que la de los vivos, esto conservan un capacidad secuestrante considerable.

4.4.7.6 Estudio del efecto protector de los microorganismos totales del kefir en línea celular HepG2 expuesta a aflatoxina B₁.

En la Figura 4.4.13 se observa la actividad deshidrogenasa mitocondrial y LDH de células HepG2 expuestas a distintas concentraciones de AFB₁ con o sin presencia de microorganismos totales del kefir.

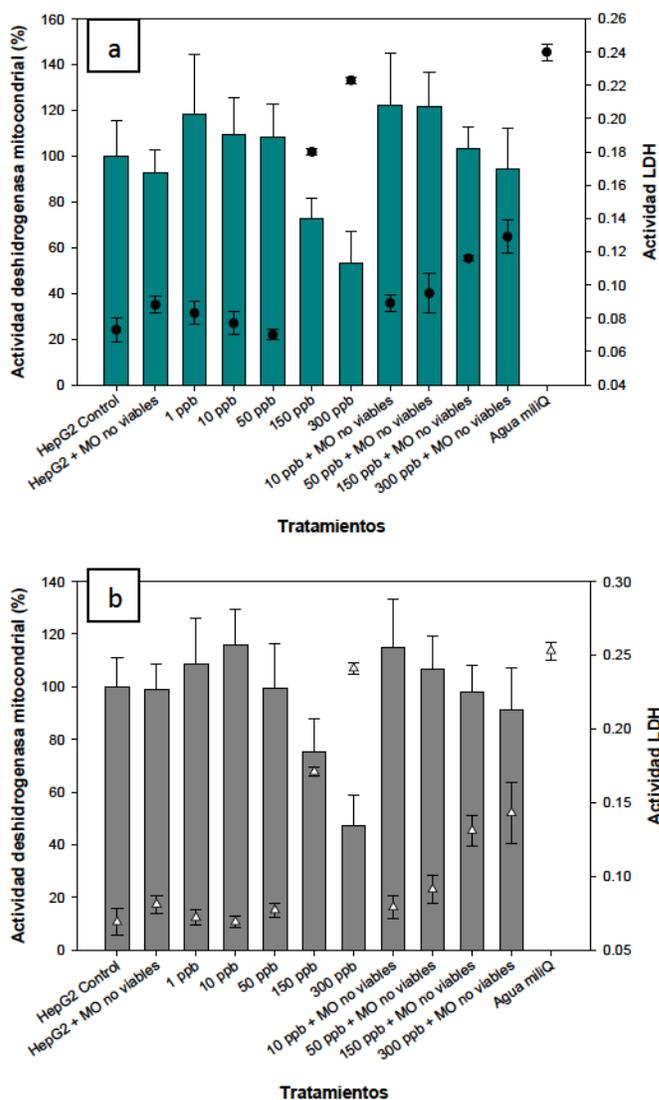


Figura 4.4.13 Actividad deshidrogenasa mitocondrial (barras) y LDH (puntos) de células HepG2 expuestas a distintas concentraciones de AFB₁ con o sin presencia de microorganismos totales del kefir. El ensayo se realizó por cuadruplicado y se repitió dos veces (a y b). Se utilizó las mismas células HepG2 para los dos ensayos mostrados en (a) y lo mismo ocurrió para los ensayos mostrados en (b).

En primer lugar se observó que los microorganismos del kefir muertos no produjeron cambios significativos en la viabilidad celular estimada a través de la actividad deshidrogenasa mitocondrial, pero produjeron un leve aumento de la actividad lactato deshidrogenasa. También, las concentraciones más bajas de AFB₁ (1 ppb, 10 ppb y 50 ppb) ocasionaron un aumento de la actividad deshidrogenasa mitocondrial (excepto cuando se usó 50 ppb en el segundo ensayo) y lactato deshidrogenasa por encima del control, sin AFB₁. Los tratamientos con las mayores concentraciones de AFB₁ (150 ppb y 300 ppb) ocasionaron la menor actividad deshidrogenasa mitocondrial y los mayores aumentos de la actividad lactato deshidrogenasa, indicando el mayor daño celular. Es decir, mediante los dos métodos usados podemos ver el daño ocasionado por la AFB₁ a las células HepG2. La adición de los microorganismos del kefir en presencia de bajas concentraciones de AFB₁ (10 ppb y 50 ppb) no produjo cambios significativos en la actividad deshidrogenasa mitocondrial, pero si hubo diferencias en la actividad lactato deshidrogenasa, siendo más alta en los tratamientos con AFB₁ y microorganismos. Pero los cambios más significativos fueron observados en los tratamientos con las concentraciones más elevadas de AFB₁ (150 ppb y 300 ppb). El agregado de los microorganismos en estas condiciones produjo aumentos de la actividad deshidrogenasa mitocondrial, con respecto a los mismos tratamientos sin microorganismos. Es decir, que hubo protección de los microorganismos del kefir sobre las células HepG2. Estos resultados fueron corroborados mediante el método lactato deshidrogenasa, ya que el daño celular producido por 150 ppb y 300 ppb se redujo entre 35,6 – 23,39% y entre 43,42 – 40,66%, respectivamente, según el ensayo, cuando estuvieron los microorganismos del kefir presentes.

El mayor daño celular observado por ambas técnicas correspondió a la adición de agua miliQ a las células.

En conclusión, los microorganismos del kefir tuvieron la capacidad de proteger las células HepG2 del daño producido por altas concentraciones de AFB₁.

4.4.7.7 Comparación entre células HepG2 y Caco-2TC7:

Las células HepG2 mostraron mayor sensibilidad al daño causado por la AFB₁ que las células Caco-2TC7. Mediante la medición de la actividad deshidrogenasa mitocondrial se determinó la CL₅₀ de las células HepG2 frente a la AFB₁ fue de 294,09 ± 16,15 ppb. Esto no fue posible de determinar en las células Caco-2TC7 debido a que actividad deshidrogenasa mitocondrial no presentó cambios significativos entre las concentraciones estudiadas (entre 0 y 500 ppb). Se decidió no estudiar el daño celular con concentraciones más altas de AFB₁ debido a que 500 ppb, la concentración más alta estudiada, está muy por encima a los límites máximos obligatorios en alimentos establecidos en Argentina de 5 µg de aflatoxina B₁/kg (5 ppb) y 20 µg de aflatoxinas totales/kg (20 ppb) para alimentos de consumo humano (CAA, 2002).

En las células HepG2, 300 ppb de AFB₁ produjo un importante daño celular (0,223 y 0,241) medido a través del ensayo lactato deshidrogenasa, el cual fue cercano al causado por el agua miliQ (0,240 y 0,253), que ocasionó la lisis celular y el volcado citoplasmático al exterior, y por ende, todo el contenido de lactato deshidrogenasa. En cambio, cuando se trabajó con las células Caco-2TC7, 500 ppb de AFB₁ se produjo un aumento de 345,7% de la actividad enzimática con respecto al control celular sin AFB₁, pero ese daño celular equivalió al 4,61% del daño producido en la lisis celular con agua miliQ, evidenciando la gran resistencia natural de las células Caco-2TC7 a la AFB₁.

4.4.8 Conclusiones

Los microorganismos totales del kefir, los lactobacilos y levaduras aislados del gránulo de kefir demostraron capacidad de capturar aflatoxina B₁.

La capacidad de secuestrar aflatoxina B₁ cambió de acuerdo al tipo de microorganismo, al tipo de PS, al medio de cultivo del microorganismo y no tuvo relación con el porcentaje de hidrofobicidad superficial.

Tanto los microorganismos del kefir como *L. plantarum* 83114 y *K. marxianus* 8254 redujeron levemente su capacidad de secuestrar AFB₁ cuando fueron pasteurizadas.

La variación en el pH del medio del desafío también generó cambios en la capacidad de captura por microorganismo, y los pH de máxima captura fueron variables, siendo el pH 2,1 óptimo para los microorganismos totales del kefir y la levadura, mientras que para el lactobacilo fue el pH 5,1.

Los microorganismos totales del kefir tuvieron la capacidad de adherirse a las células Caco-2TC7, pero no presentaron capacidad protectora sobre éstas cuando fue expuesta a AFB₁. Por otra parte, los microorganismos totales del kefir mostraron capacidad protectora de las células HepG2 cuando estas fueron incubadas en medio con AFB₁.

CONCLUSIONES GENERALES

5 Conclusiones Generales y Perspectivas

El kefir es un alimento natural que ha sido consumido por el hombre por más de 4000 años. Tanto a partir de la tradición oral como de los trabajos publicados (como se indicó en detalle en la introducción) se le han atribuido propiedades beneficiosas para la salud.

Por otra parte, este producto fermentado natural se puede preparar en forma artesanal y es accesible a todos los grupos sociales por su bajo costo. Para su producción no se necesita un equipamiento especial, los gránulos de kefir (fermento para producir el producto fermentado) se reproducen durante la fermentación y esto permite obtener grandes cantidades de gránulos y donarlos a comunidades o personas que deseen consumirlo. Este producto es altamente seguro desde el punto de vista microbiológico ya que no se contamina con microorganismos patógenos y/o alteradores de alimentos. Esta propiedad se debe al alto contenido de ácidos orgánicos y otros metabolitos inhibitorios. Por estas razones y por el limitado conocimiento que se tiene sobre la acción antifúngica de los productos fermentados con kefir, se decidió profundizar en este trabajo sobre sus propiedades antifúngicas.

La presencia de hongos y sus micotoxinas está ampliamente distribuida en alimentos de origen vegetal como cereales y derivados y de origen animal (AFM₁ en leche). En países con altos índices de pobreza se consumen importantes cantidades de estos alimentos, lo cual constituye un riesgo para la población. El riesgo de consumo de alimentos contaminados con hongos y micotoxinas no solo está asociado a aquellos con concentraciones de micotoxinas por encima de los valores permitidos. El consumo constante de alimentos con concentraciones de micotoxinas por debajo de los límites permitidos tiene un efecto acumulativo que puede producir enfermedades crónicas como inmunosupresión, entre otras. Se conocen una gran cantidad de micotoxinas que pueden encontrarse en los alimentos y además, han sido reportados alimentos con presencia de más de una micotoxina y que algunas de estas potencian su acción tóxica cuando están juntas.

Haciendo foco en el problema de incidencia de cáncer por la ingesta de alimentos contaminados con micotoxinas, la cual está relacionada con los alimentos tradicionales en ciertos países y la falta de control sobre los mismos, y con el bajo poder adquisitivo de las personas que lo consumen, se decidió probar si el kefir (un alimento de bajo costo y de

producción casera) podía ser utilizado para disminuir la concentración de hongos y sus micotoxinas en los alimentos.

Son escasas las publicaciones referidas a la acción del kefir sobre hongos toxicogénicos. En ese sentido, Ismaiel y col. (2011) realizaron un estudio de inhibición sobre una cepa de *Aspergillus flavus* AH3 donde determinan que el peso seco del micelio producido disminuye con la concentración de filtrados de kefir, y de igual manera la producción de aflatoxina B₁. Caro y León (2014) demostraron la capacidad inhibitoria del kefir obtenido por la fermentación de “Agua de panela” (bebida autóctona Colombiana) sobre *A. ochraceus*. En nuestro grupo de investigación, León (2013) encontró que los sobrenadantes libres de células (SLC) de las leches fermentadas con gránulos de kefir poseen una acción antifúngica *in vitro* sobre *A. flavus*, la cual pudo relacionarse con la concentración de ácidos orgánicos no disociados. También evaluó la capacidad de estos SLC de prolongar la vida útil de un producto de maíz Colombiano, la “arepa antioqueña”, obteniendo resultados positivos. También evaluó en su tesis la capacidad antifúngica del permeado de suero fermentado con gránulos de kefir CIDCA AGK1 (PSFG) adicionado en una sola concentración al alimento para pollos, obteniendo resultados preliminares sobre la prolongación de la vida útil. Cabe resaltar que cepas utilizadas por esta autora, no eran toxicogénicas. Otro aspecto previo estudiado en el grupo fue la capacidad secuestrante de los microorganismos aislados del kefir encontrando que la captura de aflatoxina B₁ aumentó con la concentración de microorganismos, varió con el tiempo de incubación, con respecto al tipo de microorganismo y de acuerdo al pH e hidrofobicidad.

A fin de avanzar y profundizar dichos estudios, en esta investigación se decidió trabajar con una cepa de otra especie de *Aspergillus* ‘‘*A. parasiticus*’’, que además es productora de aflatoxinas, a fin de estudiar los efectos de los SLC no sólo sobre el crecimiento fúngico sino sobre la capacidad de producir micotoxinas. También se decidió incluir en los estudios otras tres cepas de *F. graminearum*, productoras de zearalenona.

Además se decidió profundizar los estudios sobre la fermentación del permeado de suero con gránulos de kefir CIDCA AGK1 y de la actividad antifúngica de los SLC obtenidos a partir de dichos productos fermentados. Para ello se hicieron diferentes estudios:

- Se optimizó la fermentación del permeado de suero con gránulos en función de diferentes períodos de pasajes sucesivos.
- Se estudió la inhibición de la germinación de conidios.
- Se estudió la inhibición del crecimiento fúngico en placa para la determinación del tiempo de latencia y velocidad de crecimiento fúngico.
- Se analizó el carácter fungicida o fungistático de los SLC.
- Se determinó la producción de micotoxinas tanto en medio de cultivo como en el alimento para pollos y se correlacionó con la composición del PSFG en cuanto a la concentración de ácidos orgánicos y el pH.
- Se emplearon diferentes concentraciones de PSFG adicionado al medio de cultivo y al alimento para pollos, tratando de determinar los diferentes efectos causados por éstas, tanto en la inhibición fúngica como sobre la síntesis de aflatoxina B₁.

Finalmente, en este trabajo se decidió corroborar y profundizar los estudios sobre la capacidad de captura de aflatoxina B₁ por los microorganismos totales del kefir. Así mismo, se comenzó a estudiar la acción de las aflatoxinas *in vitro* sobre monocapas celulares y el efecto protector de los microorganismos totales del kefir sobre las mismas.

A continuación se presentan las conclusiones obtenidos sobre los estudios realizados y presentados en este trabajo de tesis.

Se determinó que los microorganismos del kefir tienen la capacidad de crecer en permeado de suero, presentando cinéticas de acidificación similares a las obtenidas cuando son cultivados en leche. Sin embargo, a medida que aumenta su permanencia en permeado de suero, la biomasa de los gránulos se reduce, las cinéticas de acidificación son más lentas, y la concentración relativa de bacterias lácticas y levaduras del gránulo cambia. Además, si se piensa en una aplicación potencial del kefir o sus subproductos como conservantes y dado el deterioro que sufren los gránulos, se recomienda utilizar permeado de suero fermentado con gránulos de kefir (PSFG) adaptados al PS durante cuatro semanas como

máximo, ya que transcurrido ese tiempo, se observan cambios negativos en las características del gránulo.

Por otra parte, los SLC de PSFG de $\text{pH} \leq 4,0$, generaron los mayores porcentajes de reducción de la germinación las cepas de *F. graminearum*. Se demostró que el SLC PSFG a $\text{pH} 3,5$ tuvo capacidad fungicida sobre las cepas de *F. graminearum* evaluadas en medio sólido. La aplicación de SLC en proporciones que no causan la muerte fúngica generó producción de ZEA, en una de las cepas de *F. graminearum* estudiadas.

Cuando se trabajó con *A. parasiticus* CMUNLP7, se comprobó que los SLC PSFG ejercieron un actividad fungicida mediante métodos de inhibición en placa. La utilización de SLC PSFG en concentraciones inferiores a la fungicida en el medio de cultivo sólido causó una inhibición fúngica expresada en el incremento de la fase de latencia de *A. parasiticus* CMUNLP7 con respecto a los controles que no contenían este producto fermentado. El SLC PSFG presenta un marcado efecto antifúngico cuando es utilizado en altas concentraciones inhibiendo totalmente el crecimiento de *A. parasiticus* CMUNLP7.

Si bien el producto fermentado ejerció un efecto inhibitor sobre el crecimiento de hongos filamentosos, el agregado de SLC PSFG en los diferentes concentraciones al medio de cultivo estimuló la producción de aflatoxina B₁ comparado con el control de medio MEA sin suplementar. *A. parasiticus* CMUNLP7 es un hongo productor de aflatoxina B₁ y la concentración de aflatoxina producida no se relacionó proporcionalmente con la cantidad de SLC PSFG adicionado.

Al evaluar tratamientos con distintas mezclas de ácidos orgánicos puros se concluyó que éstos inhiben *A. parasiticus* CMUNLP7 en medio sólido hasta una mínima concentración de 19,05 mM AA: 55,55 mM AL (48,83 mM de ácidos no disociados totales).

La adición de PSFG al alimento para pollos seguido de una contaminación artificial con conidios de *A. parasiticus* CMUNLP7 sólo produjo un retraso significativo en la aparición visible del hongo, adicionando PSFG al 100% v/p. La producción de aflatoxina B₁ en el alimento contaminado artificialmente fue detectada solamente en el alimento adicionado con la máxima concentración de PSFG (100% v/v). Esto sugiere que altas concentraciones

de PSFG estimulan la síntesis de la micotoxina una vez que el hongo supera el efecto inhibitor. Por lo tanto, se hace importante desarrollar un sistema de conservación que combine diferentes barreras que incluyan la aplicación del PSFG junto a otros factores para obtener el efecto fungicida.

Comparando los resultados de inhibición fúngica realizados sobre *F. graminearum* y *A. parasiticus* CMUNLP7, se observó que estos hongos tienen una marcada diferencia en cuanto a la resistencia a los ácidos orgánicos puros. Se necesitaron 25,77 mM y 435,05 mM de ácido acético o láctico no disociado, respectivamente, cuando se aplicaron de forma individual, para producir la inhibición total de *A. parasiticus* CMUNLP7, mientras que para *F. graminearum* se requirieron 8,56 mM y 49,55 mM de ácido acético o láctico no disociado para producir el mismo efecto.

La misma tendencia se observó cuando se estudió la inhibición fúngica con mezcla de dichos ácidos, donde fue necesario emplear mezclas de ácidos no disociados totales de 9,88 mM y 48,83 mM para producir una acción fungicida sobre *F. graminearum* y *A. parasiticus* CMUNLP7, respectivamente. Sin embargo, cuando se pasó de aplicar ácidos orgánicos puros a los SLC PSFG, los sobrenadantes con concentraciones de láctico y acético no disociados totales de entre 34,08 mM - 39,10 mM fueron fungicidas para ambas especies, haciendo al *A. parasiticus* CMUNLP7 más sensible al tener en cuenta sólo la sumatoria de los ácidos no disociados. Estos resultados ha permitido ampliar la mirada sobre la complejidad de los productos fermentados con los microorganismos totales del gránulo de kefir y sugiere claramente que otros metabolitos presentes en el kefir estarían involucrados en la inhibición fúngica, tales como el ácido propiónico, el ácido feniláctico o péptidos de bajo peso molecular, los cuales han sido descritos como metabolitos producidos por bacterias ácido lácticas.

Con respecto a la producción de micotoxinas por los hongos estudiados en presencia de SLC PSFG, concentraciones no fungicidas de SLC produjeron el aumento de la síntesis de toxinas en *A. parasiticus* CMUNLP7 y en una cepa de *F. graminearum*. Por esto, la posible aplicación de los productos fermentados del kefir como bioconservante requiere futuros estudios para profundizar el análisis del efecto del kefir sobre los hongos y sus

toxinas así como la implementación de un conjunto de barreras para lograr la total inhibición fúngica.

Por otro lado, los microorganismos totales del kefir, los lactobacilos y levaduras aislados del gránulo de kefir demostraron capacidad de capturar aflatoxina B₁. La capacidad de captura de aflatoxina B₁ por microorganismos fue mayor en las levaduras, seguidas por los microorganismos totales del kefir y, por último, los lactobacilos. Además, esta capacidad fue diferente según el medio de cultivo y el origen del permeado de suero. En general, la capacidad de secuestrar aflatoxina B₁ cambió de acuerdo al microorganismo, al medio de cultivo del microorganismo y no tuvo relación con el porcentaje de hidrofobicidad superficial.

Tanto los microorganismos totales del kefir como los microorganismos aislados redujeron levemente su capacidad de capturar aflatoxina B₁ cuando fueron muertos por calor. La variación en el pH del medio del desafío también generó cambios en la capacidad de captura por microorganismo y los pH de máxima captura fueron variables. Para los microorganismos totales del kefir y la levadura fue el pH 2,1, mientras que lactobacilo tuvo mejor rendimiento a pH 5,1.

Los microorganismos totales del kefir tuvieron la capacidad de adherirse a las células Caco-2TC7, pero no presentaron capacidad protectora sobre éstas cuando fueron expuestas a aflatoxina B₁. Sin embargo, los microorganismos totales del kefir mostraron capacidad protectora de las células HepG2 cuando estuvieron en presencia de dicha aflatoxina.

De esta investigación surgen preguntas que aún no han sido contestadas. Como esta línea de trabajo se continuará con nuevos becarios, tesis doctorales y la tesis post-doctoral de quien la presenta, a continuación se listan las perspectivas a desarrollar en un futuro cercano.

A nivel de inhibición fúngica:

Es de interés central en nuestra línea la identificación de otros metabolitos con actividad antifúngica presentes en los productos fermentados con el kefir, los cuales hipotéticamente interactúan con los ácidos láctico y acético presentes. Una vez determinados los metabolitos, evaluar las condiciones fermentativas que favorecen la producción de estos metabolitos.

Este tema se desarrollará durante el post-doctorado del autor de esta tesis.

Con respecto a la captura de aflatoxinas se propone determinar:

La relevancia de paredes celulares de levaduras y bacterias ácido lácticas del kefir, qué moléculas superficiales de dichos microorganismos están involucradas en la captura, la influencia de enzimas y moléculas presentes en el tracto gastrointestinal que pudieran modificar la capacidad de captura (enzimas digestivas, bilis, mucus, HCl).

Estudiar el rol de los microorganismos totales del kefir y de los microorganismos aislados del kefir en la disminución de la absorción de aflatoxina en sistemas *in vivo* (modelos animales –ratas y aves).

Alimento para animales

Es de gran interés profundizar los estudios sobre el desarrollo de alimento para animales (aves y mascotas) suplementados con PSFG donde se prolongue la vida útil y haya un efecto benéfico tanto en la salud como en los parámetros zootécnicos de los animales.

REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

Referencias bibliográficas

- AACC (American Association of Cereal Chemists). 1997 Approved Methods of the AACC. Ninth Edition. The Association. USA.
- Abbés, S., Ben Salah-Abbe`s, J., Jebali, R., Ben Younes, R. y Oueslati R. 2015 Interaction of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in mice causes immunotoxicity and oxidative stress: Possible protective role using lactic acid bacteria. *J Immunotoxicol* DOI: 10.3109/1547691X.2014.997905
- Abraham, A. y De Antoni, G. 1999 Characterization of kefir grains in cows' milk and in soya milk. *J of Dairy Res* 66, 327-333
- Adams, M. y Hall, C. 1988 Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Int J Food Sci Tech* 23, 287-292
- Akande, K.E., Abubakar, M.M., Adegbola, T.A. y Bogoro, S.E. 2006 Nutritional and health implications of mycotoxins in animal feeds: a review. *Pak. J of Nutrit* 5 (5), 398-403.
- Alaniz, M., Chiotta, M., Giaj-Merlera, G., Barros, G. y Chulze, S. 2013 Evaluation of potential biocontrol agent for aflatoxin in Argentinean peanuts. *Int J Food Microbiol* 162, 220–225
- Álvarez, M.T., Carvajal, M., Ruisánchez, N. y Rojo, F. 2000 Aductos ADN-Aflatoxina como biomarcadores de exposición en grupos de riesgo de cáncer de hígado. *Rev Cubana Oncol* 16, 35-39.
- Amigot, S.L, Fulgueira, C.L y Basílico, J.C. 2006 New parameters to evaluate forage quality. *Posth. Biol. Tech* 41, 215-224.
- Amigot, S. L. 2009 Tesis Doctoral. Control biológico de hongos toxigénicos presentes en forrajes conservados empleando cepas de *Streptomyces*. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.
- Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filioussis, G., Ambrosiadis, I. y Koidis, P. 2008 Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: Production conditions, purification and characterization. *Bioresource Technol* 99, 5384–5390
- AOAC. 1984 Association of Official Analytical Chemistry, Official Methods of Analysis, 14th Edition. Washington D. C.

- Arla Foods ingredients. 2013 Permeate
<http://www.arlafoodsingredients.com/products/permeate-lactose/permeate/>.
Buenos Aires. Consultado 16 mayo de 2013.
- Armando, M., Dogi, C., Pizzolitto, R., Escobar, F., Peirano, M., Salvano, M., Sabini, L., Combina, M., Dalcerro, A. y Cavaglieri, L. 2011 *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environment with aflatoxin B1 detoxification ability and anti pathogenic bacteria influence *in vitro*. *World Mycotoxin J* 4, 59-68
- Arulmozhi, A., Koshy Varghese Ismail, P.K., Peethambaran, P.A. y Ramachandran, K.M. 2002 Aflatoxin residues in tissues of broiler chicken. *Indian Vet. J* 79, 901-903.
- Astoreca, A., Vaamonde, G., Dalcerro, A., Ramos, A. y Marín, S. 2012 Modelling the effect of temperature and water activity of *Aspergillus flavus* isolates from corn. *Int J Food Microbiol* 156, 60–67.
- Bailey, C.A., Latimer, G.W., Barr, A.C., Wigle, W.L., Haq, A.U., Balthrop, J.E. y Kubena, L.F. 2006 Efficacy of montmorillonite clay (NovaSli PLUS) for protecting full-term broilers from aflatoxicosis. *J. Appl. Poult. Res* 15, 198-206.
- Bennet, J. y Klich, M. 2003 Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 16, 497-516
- Bensmira, M., Nsabimana, C. y Jiang, B. 2010 Effects of fermentation conditions and homogenization pressure on the rheological properties of kefir. *LWT - Food Sci Technol* 43 (8), 1180-1184.
- Berenbaum, M.C. 1977 Synergy, additivism and antagonism in immunosuppression. A critical review. *Clin Exp Immunol* 28, 1-18.
- Berridge, M.B., Tan, A.S., McCoy, K.D. y Wang, R. 1996 The biochemical and cellular basis of cell proliferation assay that the tetrazolium salts. *Biochemica* 4, 14-19.
- Binder, E., Tan, L., Chin, L., Handl, J. y Richard, J. 2007 Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Anim Feed Sci Tech* 137, 265–282.
- Blount, W.P. 1961 "Turkey 'X' disease." *Turkeys* 9, (7) 52-61.
- Bogaert, J. y Naidu, A. 2000 Lactic acid. In: A.S. Naidu, Editor, *Natural Food Antimicrobial Systems* (pp. 613–635). CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Bogliaccini, A. 2001 Almacenamiento hermético. *Rev granos* N° XXVII. In: Rodríguez J. Bartosik R. y Malinarich, H. D. 2002. Almacenaje de granos en

bolsas plásticas: Sistema silobag, informe final de trigo. <http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/agric/posco/granos/AlmTrigo.pdf>. Accessed in june of 2009

- Bolognani, F., Rumney, C.J. y Rowland, I.R. 1997 Influence of carcinogen binding by lactic acid-producing bacteria on tissue distribution and *in vivo* mutagenicity of dietary carcinogens. *Food Chem Toxicol* 35, 535 – 545.
- Booijink, C.C., Zoetendal, E.G. y Kleerebezem, M. 2007 Microbial communities in the human small intestine: coupling diversity to metagenomics. *Future Microbiol* 2, 285 – 295.
- Bressac, B., Kew, M., Wands, J. y Ozturk, M. 1991 Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 350, 429-431.
- Brialy, C., Rivalland, P., Coiffard, L. y De Roeck Holtzhauer, Y. 1995 Microbiological study of lyophilized dairy kefir. *Folia Microbiol* 40, 198-200
- Brown, R., Chen, Z., Cleveland, T. y Russin, J. 1999 Advances in the development of host resistance in corn to aflatoxin contamination by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 89, 113-117
- Brul, S. y Coote, P. 1999 Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int J Food Microbiol* 50, 1-17
- Bueno D. 2003 Detoxificación de Micotoxinas Presentes en Alimentos de Aves de Corral. Tesis Doctoral. Universidad de Tucumán, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia - Centro de Referencia de Lactobacilos (CERELA).
- Bueno, D., Casale, C., Pizzolitto, R., Salvano, M., y Oliver, G. 2007 Physical adsorption of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model. *J Food Protect* 70, 2148-2154
- Busby, W. y Wogan, G. 1984 Aflatoxins. En: Searle C.E. (Ed.) Chemical Carcinogenesis. American Chemical Society, Washington, DC, p 945–1136
- C.A.A. 2006 Código Alimentario Argentino. Capitulo XIII. Bebidas Fermentadas. Art.1082-(Res2142,5.9.83). ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE ALIMENTOS. MINISTERIO DE SALUD. PRESIDENCIA DE LA NACIÓN. Argentina, [http://www.anmat.gov.ar/CODIGO/CAPITULO_XIII_BebFermentadas\(actualiz_09-06\).pdf](http://www.anmat.gov.ar/CODIGO/CAPITULO_XIII_BebFermentadas(actualiz_09-06).pdf).
- Calado, T., Venancio, A. y Abrunhosa, L. 2014 Irradiation for Mold and Mycotoxin Control: A Review. *Compr Rev Food Sci F* 13, 1049-1061

- Carnaghan, R.B., Hartley, R.D. y O'Kelly, J. 1963 Toxicity and Fluorescence Properties of the Aflatoxins. *Nature*, 200, 1101.
- Caro, A. y León, A. 2014 Fungal Growth Inhibition of *Aspergillus ochraceus* with “Panela” fermented with Water Kefir grains. *Vitae Colombia* 21, 191-200
- Carrillo, L. 2003 Los Hongos de los alimentos y Forrajes. Facultad de Ciencias Agrarias, UNJu y Facultad de Ingeniería, UNSa. Argentina. I.S.B.N: 978-987-9381-19-9. 130 p.
- Carrillo, L. 1995 Micología de los alimentos. Editorial Hemisferio Sur S.A. I.S.B.N: 950-504.
- CAST. 2003 Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. Task Force Report No, 139. Council for Agricultural Science and Technology. Ames, Iowa. USA.
- Cegielska-Radziejewska, R., Stuper, K. y Szablewski, T. 2013 Microflora and mycotoxin contamination in poultry feed mixtures from western Poland. *Annals Agr Env Medicine* 20, 30–35
- Cerveró, M. C., Castillo, M. A., Montes, R. y Hernández, E. 2007 Determination of trichothecenes, zearalenone and zearalenols in commercially available corn-based foods in Spain. *Rev Iberoam Micol* 24, 52-55.
- Chantret, I., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Brot-Laroche, E., Zweibaum, A. y Rousset, M. 1994 Differential Expression Of Sucrase-Isomaltase In Clones Isolated From Early And Late Passages of The Cells Line Caco-2: Evidence For Glucose-Dependent Negative Regulation. *J. of Cell Scienc* 107, 213-225.
- Christensen, M. y Meronuck, R. 1987 Quality maintenance in stored grains and oilseeds Minneapolis University of Minnesota Press.
- Chu-Chyn, O., Yi-Heng, C., Shiao-Lin, L., Ya-Ju, C., Hsin-Yu, H. y Meei-Yn, L. 2012 Hepatoprotective effect of Lactic Acid Bacteria in the attenuation of Oxidative stress from tert-butyl hydroperoxide. *J Food Drug Anal* 20, 101-110.
- Chulze, S., Palazzini, J., Torres, A., Barros, G., Ponsone, M., Geisen, R., Schmidt-Heydt, M. y Köhl, J. 2014 Biological control as a strategy to reduce the impact of mycotoxins in peanuts, grapes and cereals in Argentina *Food Addit Contam Part A* doi/full/10.1080/19440049.2014.984245

- Ciegler, A., Burmaister, H., Vesonder, R. y Hesseltine, C. 1981 Mycotoxins: occurrence in the environment. En: Shank R. (Ed) Mycotoxins and N-Nitro-Compounds: Environmental Risks. CRC Press, Boca Raton, FL, p 1–50
- Cole, R. y Cox, R. 1981 Handbook of Toxic Fungal Metabolites. Academic Press, New York.
- Commission Regulation (EU) 2011 “Amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for nitrite, melamine, *Ambrosia* spp. and carry-over of certain coccidiostats and histomonostats and consolidating Annexes I and II thereto. *Official J Eur Union* L159/7.
- Correa, M., Soria, M., Federico, F., Galliner, C., Zapata, R., Bueno, D., León, A. y De Antoni, G. 2014 Safety use of *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 in poultry feeding En: X Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2-4 Julio 2014. Mar del Plata, Argentina. Memorias en formato digital. Código de Resumen: BF-022 p.133
- Correa, M., Golowczyc, M., De Antoni, G., Pérez, P., Humen, M. y Serradell, M. 2013 Administration of kefir-fermented milk protects mice against *Giardia intestinalis* infection. *J Med Microbiol* 62, 1815–1822
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J. y Damiani, P. 1998 Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl Microbiol Biot* 50, 253-256
- Cortés-Zavaleta, O., López-Malo, A., Hernández-Mendoza, A. y García, H.S. 2014 Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. *Int J Food Microbiol* 173, 30-35
- Cramer, J. y Prestegard, J. 1977 NMR studies of pH/induced transport of carboxylic acids across phospholipids vesicle membranes. *Biochem Bioph Res Co* 75, 295-301
- Creppy, E.E. 2002 Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127 (1-3), 19-28.
- Cuppers, H., Oomes, S. y Brulm, S. 1997 A model for the combined effects of temperature and salt concentration on growth rate of food spoilage molds. *Appl Environ Microbiol* 63, 3764-3769

- CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo) 2010 Aspectos probióticos y tecnológicos de las bacterias lácticas. Edición 2010, La Plata. Capítulo 5: Acción Benéfica sobre la Salud de Bacterias Ácido Lácticas, Levaduras y sus Metabolitos. p. 71-89.
- D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., Postel, D., Dijkema, W.T.P., Dujardin, A. y Placinta, C.M. 1998 Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *Eur. J. Plant Pathol* 104, 741-751
- Dalcerro, A., Magnoli, C., Chiacchiera, S., Palacios, G. y Reynoso, M. 1997 Mycoflora and incidence of aflatoxin B₁, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia* 137, 179–184
- Dalcerro, A., Magnoli, C., Luna, M., Ancasi, G., Reynoso, M., Chiacchiera, S., Miazzi, R., y Palacio, G. 1998 Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia* 141 37–43
- Dalvi, R.R. y Ademoyero, A.A. 1984 Toxic effects of aflatoxin-B in chickens given feed contaminated with *Aspergillus flavus* and reduction of the toxicity by activated-charcoal and some chemical-agents. *Avian Dis* 28, 61-69
- Damerow, G. 2012 The Chicken Encyclopedia: An Illustrated Reference Storey, North Adams, Mass, USA.
- Davidson, P. 2001 Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds, En Doyle, M., Beuchat, L. y Montville T. (Eds) Food Microbiology: fundamentals and frontiers. ASM Press Washington D.C. p. 593-627.
- Davidson, P. y Parish, M. 1989 Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Tech* 43, 148–155
- De Man, J.C., Rogosa, M. y Sharpe, M. 1960 A medium for cultivation of lactobacilli. *J Applied Bach* 23, 130-135.
- De Saeger, S., Sibanda, L. y Van Peteghem, C. 2003 Analysis of zearalenone and α -zearalenol in animal feed using high-performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta* 487, 137-143.
- Degen, G. y Neumann, H. 1978 The major metabolite of aflatoxin B₁ in the rat is a glutathione conjugate. *Chem Bio Interaction* 22, 239-255
- Delavenne, E., Ismail, R., Pawtowski, A., Mounier, J., Barbier, G. y Le Blay, G. 2013 Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures *Food Control* 30, 206-213

- Delavenne, E., Cliquet, S., Trunet, C., Barbier, G., Mounier, J y Le Blay, G. 2015 Characterization of the antifungal activity of *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np and *Lactobacillus rhamnosus* K.C8.3.1I in yogurt. *Food Microbiol* 45, 10-17
- Denli, M., Blandon, J., Guynot, M., Salado, S. y Perez J. 2009 Effects of dietary AflaDetox on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B₁. *Poult Sci* 88, 1444–1451
- Denli, M., Okan, F. y Doran, F. 2004 Effect of conjugated linoleic acid (CLA) on the performance and serum variables of broiler chickens intoxicated with aflatoxin B₁. *S. Afr. J. Anim. Sci* 34, 97-103.
- Denli, M., Okan, F., Doran, F. y Inal, T.C. 2005 Effect of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on carcass quality, serum lipid variables and histopathological changes of broiler chickens infected with aflatoxin B₁. *S. Afr. J. Anim. Sci* 35, 109-116.
- Desjardins, A., Hohn, T. y McCormick, S. 1993 Trichothecene biosynthesis in *Fusarium*: chemistry, genetics, and significance. *Microbiol Rev* 57, 595-604
- Di Constanzo, A. y Murphy, M. 2012 Strategies for Feeding Mycotoxin and Mold Contaminated Grains to Cattle. http://www.extension.umn.edu/agriculture/beef/components/docs/strategies_for_feeding_mycotoxin_and_mold_contaminated_grain.pdf.
- Diaz, D., Hagler, W., Hopkins, B. y Whitlow, L. 2002 Aflatoxin binders I: *In vitro* binding assay for aflatoxin B₁ by several potential sequestering agents. *Mycopathologia* 156, 223–226
- Diaz, G., Murcia, H. y Cepeda, S. 2010 Cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of aflatoxin B₁ in chickens and quail. *Poult Sci* 89, 2461–2469
- Dickson, J. y Maynard, E. 1992 Microbiological decontamination of food animal carcasses by washing and sanitizing systems: A review. *J Food Protect* 55, 133-140
- Eaton, D. y Groopman, J. (Eds) 1994 The Toxicology of Aflatoxins. Human Health, Veterinary and Agricultural Significance. Academic Press, San Diego, CA.

- EC (European Commission). 2010 Commission Regulation EC No. 165/2010, 26 February 2010 amending Regulation EC No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Aflatoxins. *O J European Union* L50 11-12
- Ehrlich, V., Darroudi, F. y Uhl, M. 2002 Fumonisin B₁ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis* 17, 257–260
- Eklund, T. 1980 Inhibition of growth and uptake processes in bacteria by some chemical food preservatives. *J Bacteriol* 48, 423-432.
- Ellis, W., Smith, J., Simpson, B. y Oldham, J. 1991 Aflatoxins in Food: Ocurrente, Biosíntesis, Effects on Organisms, Detection and Methods of Control. *Crit Rev Food Sci* 30, 403–439
- El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S. y Ahokas J. 1998a Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁. *Food Chem Toxicol* 36 321–326
- El-Nezami, H., Salminen, S. y Ahokas, J. 1996 Biological control of food carcinogen using *Lactobacillus* GG. *Nutr Today* 31, 41 – 42.
- El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S. y Ahokas, J. 1998b Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *J Food Protect* 61, 466–468
- El-Nezami, H., Mykkanen, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S. y Ahokas, J. 2000 Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B₁ from the chicken duodenum. *J Food Protect* 63, 549–552
- Etcheverry, M., Torres, A., Ramirez, M.L., Chulze, S., Magan, N. 2002 In vitro control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* using antioxidants under different water availability and temperature regimes. *J Appl Microbiol* 92, 624 - 632.
- Fenech, M. 2000 The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res* 455, 81–95
- Fernandez, A., Belio, R., Ramos, J. J., Sanz, M. C. y Saez, T. 1997 Aflatoxins and their metabolites in the tissues, faeces and urine from lambs feeding on an aflatoxina contaminated diet. *J Sci Food Agric* 74, 161-168.
- Fernandez, A., Verde, M.T. y Gascon, M. 1994 Aflatoxin and its metabolites in tissues from laying hens and broiler-chickens fed a contaminated diet. *J. Sci. Food Agric.* 65, 407-414.

- Fernando, W. G. D., Miller, J. D., Seaman, W. L., Seifert, K., y Paulitz, T. A. 2000 Daily and seasonal dynamics of airborne spores of *Fusarium graminearum* and other *Fusarium* species sampled over wheat plots. *Can.J. Bot* 78, 497-505.
- Fink-Gremmels, J. 1999 Mycotoxins: their implications for human and animal health. *Vet Q* 21, 115-120
- Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO. Statistic Division-FAOSTAT 2013 Trends in the livestock sector, part 3, <http://www.fao.org/docrep/015/i2490e/i2490e03c.pdf>.
- Freese, E., Sheu, C. y Galliers, E. 1973 Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature* 241, 321-325
- Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M. y Knasmüller, S. 2008 Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria, *Food Chem. Toxicol* 46, 1398- 1407
- Gallardo, M.G. y Rodríguez, J. 1999 La Carga de la enfermedad en Santa Fe de Bogotá: Indicadores de años de vida ajustados por discapacidad (Avisa) y mortalidad, 1985-1996. Bogotá: Secretaría Distrital de Salud de Santa Fe de Bogotá.
- Garrido, C., Hernández, A. y Pacin. 2012 Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (*Zea mays L.*), from 1999 to 2010. *Food Control* 25, 660-665
- Garrote, G. 1999 Bacterias Lácticas y Levaduras para la Industria Alimentaria: Kefir. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química- Departamento de Ciencias Biológicas.
- Garrote, G., Abraham, A. y De Antoni, G. 2001 Chemical and microbiological characterization of kefir grains. *J Dairy Res* 68, 639-65
- Garrote, G., Abraham, A. y De Antoni, G. 2000 Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. *J Food Prot* 63, 364-369
- Gelderblom, W., Marasas, W. y Lebepe-Mazur S. 2002 Interaction of fumonisin B₁ and aflatoxin B₁ in a short term carcinogenesis model in rat liver. *Toxicology* 71, 161-173
- Gerez, C., Torino, M., Rollán, G. y Font de Valdez, G. 2009 Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control* 20, 144-148

- Gerez, C., Torres, M., Font de Valdez, G. y Rollán, G. 2013 Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria *Biol Control* 64, 231-237
- Gillespie, J. y Flanders, F. 2009 Modern Livestock and Poultry Production Cengage Learning Ontario Canada 8th Edition.
- Gimeno, A. 2013 Residuos de Aflatoxina M₁ en la leche y su impacto en la salud humana. III Congreso de Alimentación Animal: Seguridad Alimentaria y Producción de Alimentos. Diciembre 4, Bilbao (País Vasco) España.
- Golfopoulos, A., Kopsahelis, N., Tsaousi, K., Koutinas, A. A. y Soupioni, M. 2011 Research perspectives and role of lactose uptake rate revealed by its study using 14C-labelled lactose in whey fermentation. *Bioresource Technol* 102 (5), 4204-4209.
- Golowczyc, M. 2008 Caracterización taxonómica, probiótica y tecnológica de lactobacilos aislados de kefir. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Goswami, R. y Kistler, H. 2004 Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol Plant Path* 5, 515-525.
- Gqaleni, N., Smith, J., Lacey, J. y Gettinby, G. 1997 Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. *Appl Environ Microbiol* 63, 1048–1053.
- Gram, H. 1884 Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten: in Schnitt-und Trockenpräparaten. *Fortschritte Der Medicin* 2, 185–189.
- Gratz, S., Mykkänen, H., Ouwehand, A., Juvonen, R., Salminen, S. y El-Nezami, H. 2004 Intestinal mucus alters the ability of probiotic bacteria to bind aflatoxin B1 *in vitro*. *Appl Environ Microbiol* 70, 6306-6308
- Greco, M., Franchi, M., Rico, S., Pardo, A. y Pose, G. 2014 Mycotoxigenic fungi in poultry feed for food-producing animals. *Sci Word J* v.2014. Article ID 968215 <http://dx.doi.org/10.1155/2014/968215>
- Groopman, J., Jiaqui, Z. y Donahue, P. 1992 Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-DNA adducts in people living in Guangxi Autonomous Region. People's Republic of China. *Cancer Res* 52, 45 – 52.

- Gwiazdowska, D., Czaczyk, K., Filipiak, M. y Gwiazdowski, R. 2008 Effects of *Propionibacterium* on the growth and mycotoxin production by some Species of *Fusarium* and *Alternaria*. *Pol J Microbiol* 57 (3), 205-212.
- Hansen, C. H. y Brüner, N. 1998 Cell Biology: A Laboratory Handbook. Vol. 1. Academic Press, Londres, UK.
- Harvey, R., Edrington, T. y Kubena, L. 1995 Influence of aflatoxin and fumonisin B1 containing culture material on growing barrows. *AM J Vet Res* 56, 1668–1672
- Haskard, C., Binnion, C. y Ahokas, J. 2000 Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chem-Biol Interact* 128, 39 – 49.
- Haskard, C., El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S. y Ahokas, J. 2001 Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. *Appl Environ Microb* 67, 3086 –3091
- Hendrickse, R. 1999 Of sickturkeys, kwashiorkor, malaria, perinatal mortality, heroin addicts and food poisoning: Research on the influence of aflatoxins on child health in the tropics. *Ann Trop Paediatr* 19, 229-236.
- Hernández-Mendoza, A., García, H. y Steele, J. 2009 Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B₁. *Food Chem Toxicol* 47, 1064 – 1068
- Hill, R., Wilson, D., McMillan, W., Widstrom, N., Cole, R., Sanders, T. y Blankenship, P. 1985 Ecology of *Aspergillus flavus* group and aflatoxin formation in maize and groundnut. En: Lacey J. (Ed.) *Trichothecenes and other Mycotoxins* John Wiley and Sons Chichester. pp. 79–95
- Hollinger, K. y Ekperigin, H.E. 1999 Mycotoxicosis in food producing animals. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 15 (1), 133-165.
- Holzapfel, W., Geisen, R. y Schillinger, U. 1995 Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int J Food Microbiol* 24, 343-362
- Hsieh, D. y Wong, J. J. 1994 Pharmacokinetics and Excretion of Aflatoxins. In: *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance* (Eaton D. L., Groopman J., eds), 73-88. New York: Academic Press.
- Hsu, I., Metcalf, R., Sun, T., Welsh, J., Wang, N. y Harris, C. 1991 Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 350, 427-428

- Huff, W., Kubena, L., Harvey, R. y Phillips, T. 1992 Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A. *Poult Sci* 71, 64–69
- Hunter, D. y Segel, I. 1973 Effect of weak acids on amino acid transport by *Penicillium chrysogenum*. Evidence for a proton or charge gradient as the driving force. *J Bacteriol* 113, 184-1192
- Hussain, S., Schwank, J., Staib, F., Wang, X. y Harris, C. 2007 TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene* 26, 2166-2176
- IARC-International Agency for Research on Cancer. 1993 Aflatoxins: naturally occurring aflatoxins (Group 1), aflatoxins M1 (Group 2B). The International Agency for Research on Cancer. (56): 245, 489, 397-445, 467.
- IARC-International Agency for Research on Cancer. 1993 Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 56, 1–599
- IARC-International Agency for Research on Cancer. 1994 Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Hepatitis viruses. *IARC* Lyon, France 59
- IARC-International Agency for Research on Cancer. 2002 Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 82, 1–556
- IARC-International Agency for Research on Cancer 2006. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans IARC-WHO Lyon France p 2
Consultado 16 de febrero de 2015
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Preamble/CurrentPreamble.pdf>.
- IARC-International Agency for Research on Cancer. 2012 Chemical Agents and Related Occupations. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 100F. Consultado 16 de febrero de 2015
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F-23.pdf>.
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsGroupOrder.pdf>
- Ibrahim, I., Shareef, A. y Al-Joubory, K. 2000 Ameliorative effects of sodium bentonite on phagocytosis and Newcastle disease antibody formation in broiler chickens during aflatoxicosis. *Res Ve. Sci* 69119–122

- ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1996 Toxigenic fungi: *Aspergillus*. En: Microorganisms in Foods. 5. Microbiological Specifications of Food Pathogens London Blackie Academic and Professional 347–381
- ICONTEC - Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. 1994 Manual de Métodos Analíticos para el Control de Calidad en la Industria Alimentaria, GTC1. 1.17.5. Azúcares, Determinación en Solución por Refractometría. Bogotá: ICONTEC, 1994.
- ILSI Argentina. 2006 Maíz y Nutrición Informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal, Vol. 2 http://www.ilsa.org.ar/biblioteca/Maiz_y_Nutricion.pdf 7e8.
- INDEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos de la República Argentina). 2009 <http://www.indec.mecon.ar/>.
- INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). 2014 Lactosuero: de desecho industrial a producto con valor agregado. <http://inta.gob.ar/lecheria/lecheria/noticias/la-web-del-ecosuero>.
- Ismaiel, A., Ghaly, M. y El-Naggar, A. 2011 Milk Kefir: Ultrastructure, Antimicrobial Activity and Efficacy on Aflatoxin B₁ Production by *Aspergillus flavus*. *Curr Microbiol* 62, 1602–1609
- Jay, J. 2000 Modern food microbiology Gaithersburg MD Aspen Publishers.
- Kakisu, E. 2010 Desarrollo y Optimización del proceso para la elaboración de leches fermentadas con microorganismos aislados de gránulos de kefir con características tecnológicas y probióticas definidas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 180 p.
- Kakisu, E., Abraham, A., Pérez, P. y De Antoni, G. 2007 Inhibition of *Bacillus cereus* in Milk Fermented with Kefir Grains. *J Food Prot* 70, 2613-2616.
- Kamdem, L., Flockhart, D. y Desta, Z. 2006 Dominant contribution of P450 3A4 to the hepatic carcinogenic activation of aflatoxin B₁. *Chem Res Toxicol* 19, 577–586
- Kaoud, M. 2014 Innovative methods for the amelioration of aflatoxin (AFB₁) effect in broiler chicks. *VISI J Akademik* 1, 12-17
- Kendirci, P. y Altuğ, T. 2004 Carry-over of aflatoxin M₁ from milk to kefir and kefir grain. *Milchwissenschaft* 59 (7/8), 399–401.

- Kensler, T., Qian, G., Chen, J. y Groopman, J. 2003 Translational strategies for cancer prevention in liver. *Nat Rev Cancer* 3, 321-329
- Kew, M. 2013 Aflatoxins as a Cause of Hepatocellular Carcinoma. *J Gastrointestin Liver Dis* 22, 305-310
- Khosravi, A., Dakhili, M. y Shokri, H. 2008 A mycological survey on feed ingredients and mixed animal feeds in Ghom province. *Iran Pak J Nutr* 7, 31–34
- Kokkonen, M., Magan, N. y Medina, A. 2014 Comparative effects of fungicides and environmental factors on growth and T-2 + HT-2 toxin production by *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae* strains on an oat-based matrix. *World Mycotoxin J* 177-186
- Kosikowski, F. 1982 Cheese and fermented foods milk. Second Edition. Kosikowski and Associates New York DC 945–1136
- Kozakiewicz, Z. 1989 *Aspergillus* species on stored products. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey.
- Krska, R. y Josephs, R. 2001 The state-of-the-art in the analysis of estrogenic mycotoxins in cereals. *Fresenius J Anal Chem* 369, 469-476.
- Kruger, M., Barbosa, M., Miranda, A., Landgraf, M., Destro, M. y Todorov, S. 2013 Isolation of bacteriocinogenic strain of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* from rocket salad (*Eruca sativa* Mill.) and evidences of production of a variant of nisin with modification in the leader-peptide. *Food Cont* 33, 467-476
- Kubena, L., Edrington, T. y Kampsholtzapple, C. 1995 Effects of feeding fumonisin B₁ present in *Fusarium moniliforme* culture material and aflatoxin singly and in combination to Turkey poults. *Poult Sci* 74-1295
- Kumar, S., Tamura, K. y Nei, M. 2004 MEGA3: integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5(2), 150-163.
- Labuda, R. y Tančinov, D. 2006 Fungi recovered from slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenity. *Ann Agric Environ Med* 13 (2), 193-200.
- Lacey, J. 1989 Pre and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other sored products. *J appl Bacteriol symposium supplement* 11S-25S.
- Lahtinen, S.J., Haskard, C.A., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J. y Ahokas, J.T. 2004 Binding of aflatoxin B₁ to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Addit Contam* 21, (2), 158 – 164

- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A. y Gobbetti, M. 2000 Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl Environ Microb* 66, 4084-4090
- Lavermicocca, P., Valerio, F. y Visconti, A. 2003 Antifungal activity of phenyllactic acid against moulds isolated from bakery products. *Appl Environ Microb* 69, 634–640
- Lee, Y., El-Nezami, H., Haskard, C.A., Gratz, S., Puong, K., Salminen, S. y Mykkanen, H. 2003 Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B₁ by viable and nonviable bacteria. *J Food Protect* 66, 426–430
- León, A. 2013 Estudio de la capacidad de los microorganismos del kefir, para inhibir el desarrollo fúngico y para secuestrar micotoxinas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Ciencias Biológicas. 168 p.
- León, A., Quintero, E., Serna, A., Gamba, R., De Antoni, G. y Giannuzzi, L. 2012 Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation. *Food Control* 24, 177-183
- Leong, Y., Rosma, M., Lati, A. y Izzah, A. 2012 Association of serum aflatoxin B₁-lysine adduct level with socio-demographic factors and aflatoxin intake from nuts and related nut products in Malaysia. *Int J Hyg Environ Health* 215, 368-372
- Lewis, C., Smith, J. y Anderson, G. 1999 Increased cytotoxicity of food-borne mycotoxins toward human cell lines in vitro via enhanced cytochrome p450 expression via the MTT bioassay. *Mycopathologia* 148, 97-102
- Liddell, C. 2003 Systematics of *Fusarium* species and allies associated with *Fusarium* head blight. In Leonard K. y Bushnell W. (Eds) *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley* The American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 35-43
- Lind, H., Jonsson, H. y Schnürer, J. 2005 Antifungal effect of dairy propionibacteria, contribution of organic acids. *Int J Food Microbiol* 2, 157-165
- Lindgren, S.E. y Dobrogosz, W.J. 1990 Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol Rev* 87, 149–164.
- Liu, Y. y Wu, F. 2010 Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environ Health Perspect* 118, 818- 824

- Londero, A. 2012 Alimentos funcionales: Obtención de un producto probiótico para aves a partir de suero de quesería fermentado con microorganismos de kefir. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Londero, A., De Antoni, G., Abraham, A. y Garrote, G. 2011 Inhibitory activity of cheese whey fermented with kefir grains. *J Food Protect* 74, 94-100
- Londero, A., Iraporda, C., Garrote, G. y Abraham, A. 2015 Cheese whey fermented with kefir micro-organisms: Antagonism against *Salmonella* and immunomodulatory capacity. *Int J Dairy Technol* 68, 118-126
- Londero, A., León, A., Diosma, G., De Antoni, G., Abraham, A. y Garrote, G. 2014 Fermented whey as poultry feed additive to prevent fungal contamination. *J Sci Food Agric* 94, 3189-3194
- López-Malo, A., Palou, E., Parish, M. y Davidson, P. 2005 Methods for activity assay and evaluation of results. In Davidson P. Sofos J. & Branen L. (Eds) *Antimicrobials in foods* (3rd ed.). New York Marcel Dekker p. 659-680
- Magalhães, K., Pereira, M. A., Nicolau, A., Dragone, G., Domingues, L. y Teixeira, J. A. 2010 Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: Evaluation of morphological and microbial variations. *Bioresource Technol* 101(22), 8843-8850.
- Magan, N., Hope, R., Colleate, A. y Baxter, E. 2002 Relationship Between Growth and Mycotoxin Production by *Fusarium* species, Biocides and Environment. *Eur J Plant Pathol* 108, 685-690
- Magnoli, C., Chiacchiera, S., Miazzo, R., Palacio, G., Angeletti, A., Hallak, C. y Dalcero, A. 2002 The mycoflora and toxicity of feedstuffs from a production plant in Cordoba, Argentina. *Mycotoxin Res* 18, 7-22.
- Magnoli, C., Dalcero, A., Chiacchiera, S., Miazzo, R. y Saenz, M. 1998 Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. *Mycopathologia* 142, 27-32
- Magnoli, C., Saenz, M., Chiacchiera, S. y Dalcero, A. 1999 Natural occurrence of *Fusarium* species and fumonisin production by toxigenic strains isolated from poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia* 145, 35-41
- Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J. y Schnürer, J. 2003 Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 219, 129-135

- Magnusson, J. y Schnûrer, J. 2001 *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal compound. *Appl environ microbiol* 67, 1-5
- Marshall, V. 1993 Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. *J Soc Dairy* 46, 49-56.
- Massey, T., Stewart, R., Daniels, J. y Liu, L. 1995 Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B₁ carcinogenicity. *Proc Soc Exp Biol Me.* 208, 213–227
- Mata, J. E., Yu, Z., Gray, J. E., Williams, D. E. y Rodriguez-Proteau, R. 2004 Effects of chlorophyllin on transport of dibenzo(a, l)pyrene, 2amino1methyl6phenylimidazo [4,5b]pyridine, and aflatoxin B₁ across Caco-2 cell monolayers. *Toxicology* 96, 117-125.
- Mc Kean, C., Tang, L., Tang, M., Billam, M., Wang, Z., Theodorakis, C., Kendall, R y Wang, J. 2006 Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B₁ and Fumonisin B1 in animals and human cells. *Food Chem Toxicol* 44, 868-876
- McGlynn, K., Hunter, K., Le Voyer, T., Roush, J., Wise, P. y Michielli, R. 2003 Susceptibility to aflatoxin B₁-related primary hepatocellular carcinoma in mice and humans. *Cancer Res* 63, 4594-4601.
- Merino, L. 2014 Estudio de la fermentación con gránulos de kefir de leche fortalecida con vitaminas y minerales. Tesina Licenciatura en Biotecnología. Centro de Investigación en Criotecnología de los alimentos. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.
- Miao, J., Guo, H., Ou, Y, Liu, G., Fang, X., Liao, Z., Ke, Ch., Chen, Y., Zhao, L. y Cao, Y. 2014 Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China. *Food cont* 42, 48-53
- Miazzo, R., Peralta, M., Magnoli, C., Salvano, M., Ferrero, S., Chiacchiera, S., Carvalho, E., Rosa, C. y Dalcerro, A. 2005 Efficacy of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin. *Poult Sci* 84, 1–8
- Miller, J. y Trenholm, H. 1994. Mycotoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxins. Eagan Press, St Paul, MN.

- Milus, E.A. y Parsons, C.E. 1994 Evaluation of foliar fungicides for controlling *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Dis* 78, 697-699
- Molina, M. y Giannuzzi, L. 1999 Combined effect of temperature and propionic acid concentration on the growth of *Aspergillus parasiticus*. *Food Res Int* 32, 677-682.
- Monge, M., Dalcero, A., Magnoli, C. y Chiacchiera, S. 2013 Natural co-occurrence of fungi and mycotoxins in poultry feeds from Entre Rios. *Food Addit Contam Part B Surveill* 6, 168–174
- Monge, M., Magnoli, C. y Chiacchiera, S. 2012 Survey of *Aspergillus* and *Fusarium* species and their mycotoxins in raw materials and poultry feeds from Cordoba, Argentina. *Mycotoxin Res* 28, 111–122
- Montesano, R. 1997 Hepatocellular carcinoma: From gene to public health. *J Natl Cancer Inst* 89, 1844 – 1852
- Moon, N. J. 1983 Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate, and their synergistic mixtures. *J Appl Bacteriol* 55, 453-460.
- Moretti, A. 2013 Determinación de la estabilidad del gránulo de Kefir liofilizado Tesina Licenciatura en Ciencia y Tecnología de Alimentos Facultad de Ciencias Exactas Universidad de La Plata 72 p.
- Mosmann, T. 1983 Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Moss, M. 2002 Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *Int Biodeter Biodegr* 50, 137-142
- Moss, M. 1991 The environmental factors controlling mycotoxin formation. En: Smith J. Henderson R. (Eds.) *Mycotoxins and animalfoods* CRC Press Boca Ratón Florida.
- Moss, M. y Frank, J. 1985 Influence of the fungicide tridemorph on T-2 toxin production by *Fusarium sporotrichioides*. *T Brit Mycol Soc* 84, 585–590
- Moure, C. 2013 Determinación de la Capacidad Inhibitoria del Crecimiento de *Aspergillus parasiticus* y *Penicillium* sp. con Sobrenadantes Libres de Células de Permeado de Suero Fermentado con Gránulos de Kefir y Microorganismos Aislados del Kefir. Tesina Licenciatura en Ciencia y Tecnología de Alimentos Facultad de Ciencias Exactas Universidad de La Plata. 84 p.

- Neogen Corporation. 2008 Veratox(x) HS Quantitative Aflatoxin High Sensivity Test. USA/Canadá.
- Nesbitt, B.F., O' Elly, J., Rgeant, K. y Shkdan, A. 1962 Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature* 1062-1063.
- Niku-Paavola, M.-L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T. y Haikara, A. 1999 New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *J Appl Microbiol* 86, 29–35.
- Nyamongo, J. y Okioma, M. 2005 “The aflatoxin outbreaks in Kenya in 2004 and 2005: a case study,” in *Proceedings of the Conference on Reducing Impact of Mycotoxins in Tropical Agriculture with Emphasis on Health and Trade in Africa* p. 3, Accra, Ghana.
- Oatley, J., Rarick, M., Ji, G. y Linz, J. 2000 Binding of aflatoxin B₁ to bifidobacteria *in vitro*. *J Food Protect* 63(8), 1133–1136.
- Oguz, H. y Kutoglu, V. 2000 Effect of clinoptilolite on fattening performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. *Br Poult Sci* 41, 512-517
- OJEC. 2002 Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed *Official Journal of the European Communities* L 140/10
- OJEU. 2006 Commission recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding *Official Journal of the European Union* L229/7
- Okiki, P., Ojeizeh, T. y Ogbimi, A. 2010 Effects of Feeding Diet Rich in mycotoxins on the Health and Growth Performances of Broiler Chicken. *Int Jou Poult Sci* 9, 1136-1139
- Okoli, I., Nweke, C., Okoli, C. y Opara, M. 2006 Assessment of the mycoflora of commercial poultry feeds sold in the humid tropical environment of Imo State, Nigeria. *Int J Env Sci Tech* 3, 9–14
- Onilude, A., Fagade, O., Bello, M. y Fadahunsi, I. 2005 Inhibition of aflatoxin – producing aspergilli by lactic acid bacteria isolates from indigenously fermented cereal gruels. *Afr J Biotechnol* 12, 1404-1408
- Oozeer, R., Leplingard, A., Mater, D.D.G., Mogenet, A., Michelin, R., Seksek, I., Marteau, P., Dore, J., Bresson, J.L. y Corthier, G. 2006 Survival of *Lactobacillus*

- casei* in the human digestive tract after consumption of fermented milk. *Appl Environ Microbiol* 72, 5615 – 5617.
- Orrhage, K., Sillerstroom, E., Gustafsson, J.-A., Nord, C.E. y Rafter, J. 1994 Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mut Res* 311, 239 – 248.
 - Oyagbemi, A., Azeez, O. y Saba, A. 2010 Hepatocellular carcinoma and the underlying mechanisms. *Afr Health Sci* 10, 93–98
 - Palazzini, J., Groenenboom-de Haas, B., Torres, A., Köhl, J. y Chulze, S. 2013 Biocontrol and population dynamics of *Fusarium* spp. on wheat stubble in Argentina. *Plant Pathol* 62, 859-866
 - Parry, D., Jenkinson, P. y McLeod, L. 1995 *Fusarium* ear blight (scab) in small-grain cereals: a review. *Plant Pathol* 44, 207-238
 - Paulitz, T. 1999 *Fusarium* head blight: a re-emerging disease. *Phytoprotection* 80, 127-133
 - Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J. y Salminen, S. 2001 Aflatoxin B₁ Binding by Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *J Dairy Sci* 84, 2152–2156
 - Peltonen, K., El-Nezami, H., Salminen, S. y Ahokas, J. 2000 Binding of aflatoxin B₁ by probiotic bacteria. *J Sci Food Agr* 80, 1942–1945.
 - Pereira, P., Nesci, A y Echeverry, M. 2007 Effects of biocontrol agents on *Fusarium verticillioides* count and fumonisin content in the maize agroecosystem: impact on rhizospheric bacterial and fungal groups. *Biol Control* 42, 281–287
 - Pereira, P., Nesci, A. y Echeverry, M. 2009 Efficacy of bacterial seed treatments for the control of *Fusarium verticillioides* in maize. *Biol Control* 54, 103–111
 - Perez, P. 2013 Cultivos de células eucarióticas y su utilidad para modelar la interacción entre los microorganismos y el hospedador. Curso de Postgrado. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. pp 10.
 - Phillips, T. 1999 Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxin-induced disease. *Toxicol Sci* 52, 118–126
 - Phillips, T., Kubena, L., Harvey, R., Taylor, D. y Heidelbaugh, N. 1988 Hydrated calcium aluminosilicate: A high affinity sorbent for aflatoxin. *Poult Sci* 67, 243–247

- Piermaría, J., De la Canal, M. y Abraham, A. 2008 Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloid* 22, 1520–1527
- Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M-D., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J. y Zweibaum, A. 1983 Enterocyte-like Differentiation and Polarization of the Human Colon Carcinoma Cell Line Caco-2 in Culture. *Biol Cell* 47, 323-330.
- Pirgozilev, S., Edwards, S., Hare, M. y Jenkinson, P. 2003 Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *Eur J Plant Pathol* 109, 731-742
- Pitt, J. y Hocking, A. 2009 Fungi and food spoilage. Blackie Academic and Professional London.
- Pitt, J. 2000 Toxigenic fungi: Which are important? *Med Mycol* 38, 17-22.
- Pitt, J. y Miscamble, B. 1995 Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *J Food Prot* 58, 86–90
- Pizzolitto, R. 2011 Prevención de micotoxicosis en la industria avícola por microorganismos bioeliminadores de toxinas fúngicas. Tesis Doctoral. Departamento de Biología Molecular. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.
- Pizzolitto, R., Armando, M., Combina, M., Cavaglieri, L., Dalcerro, A. y Salvano, M. 2012 Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains as probiotic agent with aflatoxin B₁ adsorption ability for use in poultry feedstuffs. *J Environ Sci Health B* 47, 933-41
- Ponsone, M., Chiotta, M., Combina, M., Dalcerro, A y Chulze, S. 2011 Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in grapes. *Int J Food Microbiol* 151, 70–77
- Pozzi, C., Correa, B., Xavier, J., Direito, G., Orsi, R. y Matarazzo, S. 2001 Effects of prolonged oral administration of fumonisin B₁ and aflatoxin B₁ in rats. *Mycopathologia* 151, 21–27
- Presello, D. y Botta, G. 2004 Podredumbres de espiga de maíz y micotoxinas asociadas. *Idia XXI. Año IV. N° 6.* p. 152-157.
- Qi, L., Bai, T., Chen, Z., Wu, F., Chen, Y., De Xiang, B., Peng, T., Han, Z. y Li, L. 2015 The p53 mutation spectrum in hepatocellular carcinoma from Guangxi,

China: role of chronic hepatitis B virus infection and aflatoxin B1 exposure *Liver Int.* 35, 999-1009

- Ramirez, M., Chulze, S. y Magan, N 2004 Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxinivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Prot* 23, 117–125
- Rawal, S., Kim, J. E. y Coulombe, R. 2010 Aflatoxin B₁ in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Res Vet Sci* 89 (3), 325-331.
- Restaino, L., Komatsu, K.K. y Syracuse, J. 1981 Effects of acids on potassium sorbate inhibition of food-related microorganisms in culture media. *J Food Sci* 47, 134-143.
- Restaino, L., Lenvich, L.M. y Bills, S. 1982 Effect of acids and sorbate combinations on the growth of four osmophilic yeasts. *J Food Prot* 45, 1138-1142.
- Richard, J.L., Payne, G.A., Desjardin, A.E., Maragos, C., Norred, W.P., Pestka, J.J., Phillips, T.D., Van Egmond, H.P., Vardon, P.J, Whitaker. T.B. y Wood, G. 2003 Mycotoxins, risks in plant, animal and human systems', CAST Task Force Report 139. Council for Agricultural Science and Technology. Ames, Iowa, USA, 101-103.
- Rimada, P. S. y Abraham, A. G. 2001 Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. *J Dairy Res* 68 (4), 653-661.
- Rochette, F., Engelen, M. y Vanden Bossche, H. 2003 Antifungal agents of use in animal health - practical applications. *J Vet Pharmacol Therapeu* 26, 31-53
- Rogers, L. 1928 The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J Bacteriol* 16, 321
- Ross, R., Wogan, G., Groopman, J., Yuan, J., Qian, G. y Gao, T. 1992 Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. *Lancet* 339, 943-46
- Rouse, S., Harnett, D., Vaughan, A. y van Sinderen, D. 2008. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *J Appl Microbiol* 104 (3), 915-923.
- Rubin, H. 1978 Toxicological model for a two-acid system. *Appl Environ Microb* 36, 623-624
- SAGPyA Secretaria de Agricultura, Ganadería y Pesca 2005 http://www.minagri.gob.ar/SAGPyA/agricultura/analisis_economico/03-Exportaciones/index.php.

- Salmond, C., Kroll, R. y Booth, I. 1984 The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 130, 2845-2850
- Saloff-Coste, C. 1996 Kefir. Nutritional and Health benefits of yoghurt and fermented milks. *Danone World Newsletter* 11, 1-7
- Santos, O. 1999 Importancia y efectos de la aflatoxina en los seres humanos. *MedUNAB* 2, 124-129
- Schnurer, J. y Magnusson, J. 2005 Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci Tech* 16, 70–78
- Schweminger, S. y Meile, L. 2004 A mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts. *Syst Appl Microbiol* 27, 229-237
- Scudamore, K. y Livesey, C. 1998 Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *J Sci Food Agric* 77, 1-17
- Servin, A. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 28, 405-440
- Shareef, A. 2010 Molds and mycotoxins in poultry feeds from farms of potential mycotoxicosis. *Iraqi J Vet Sci* 24, 17–25
- Sharma, R. y Salunkhe, D. 1991 Mycotoxins and Phytotoxins. CRC Press Boca Raton FL.
- Shi, Y.H., Xu, Z.R., Feng, J.L. y Wang, C.Z. 2006 Efficacy of modified montmorillonite nanocomposite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Anim Feed Sci Technol* 129, 138-148.
- Smith, A. y Hussey, M. 2005 Gram Stain Protocol.
- Soriano del Castillo, J. 2007 Micotoxinas en Alimentos. Díaz de Santos Madrid España pp. 424
- Speranza, J. 2011 Ecosuero con valor agregado. Noticiero Tecnológico de la Región Centro. INTI. Ministerio de Industria. Presidencia de la Nación N° 16. Octubre de 2011. http://www.inti.gob.ar/noticiero_centro_2011/ntc16.html. Consultado mayo 14 de 2012.
- Steyn, P. y Stander, M. 1999 Mycotoxins as causal factors of disease in humans. *J Toxic-Toxin Revi* 8, 229-243

- Stiles, J., Penkar, S., Plockova, M., Chumchalova, J. y Bullerman, L.B. 2002 Antifungal activity of sodium acetate and *Lactobacillus rhammosus*. *J Food Prot* 65, 1188-1191.
- Stratford, M., Plumridge, A., Nebe-von-Caron, G. y Archer, D. 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. *Int J Food Microbiol* 136, 37–43
- Strosnider, H., Azziz-Baumgartner, E. y Banziger, M 2006 Work group report: Public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environ Health Perspect* 114, 1898-1903
- Sudakin, D. 2003 Dietary aflatoxin exposure and chemoprevention of cancer: a clinical review. *J Toxicol Clin Toxicol* 41, 195-204
- Suomalainen, T. y Mäyrä-Makinen, A. 1999 Propionic acid bacteria as protective cultures in fermented milks and breads. *Lait* 79, 165-174
- Terahara, N., Toki, K., Saito, N., Honda, T., Matsui, T. y Osajima, Y. 1998 Eight new anthocyanins, ternatins C1-C5 and D3 and perternatins A3 and C4 from young *Clitoria ternatea* flowers. *J Nat Prod* 61, 1362-1367.
- Terse, P., Madhyastha, M., Zuravac, O., Stringfellow, D., Marquardt, R. y Kempainen, B. 1993 Comparision of *in vitro* and *in vivo* biological activity of mycotoxins. *Toxicon* 31, 1-7
- Thyagaraja, N. y Hosono, A. 1994 Binding properties of lactic acid bacteria from 'Idly' towards food-borne mutagens. *Food Chem Toxicol* 32, 805 – 809.
- Toba, T. 1987 Fermented milks produced with mesophilic lactic acid bacteria. Kefir and Scandinavian ropy sour milk. *Jpn J Dairy Sci* 36, 235-244.
- Tolleson, W., Melchior, W., Morris, S., McGarrity, L., Domon, O., Muskhelishvili, L., James, S. y Howard, P. 1996 Apoptotic and antiproliferative effects of fumonisin B₁ in human keratinocytes, fibroblasts, esophageal epithelial cells and hepatoma cells. *Carcinogenesis* 17, 239–249.
- Tuomola, E. M. y Salminen, S. J. 1998 Adhesion of some probiotic and dairy lactobacillus strains to Caco-2 cell cultures. *Int J Food Microbiol* 41 (1), 45-51.
- Ueno, Y., Iijima, K., Wang, S., Sugiura, Y., Sekijima, M., Tanaka, T., Chen, C. y Yu, S. 1997 Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver

- cancer: a 3-year study of corn harvested in Haimen, China by HPLC and ELISA. *Food Chem Toxicol* 35, 1143–1150
- Urrego, J. y Díaz, G. 2006 Aflatoxinas: Mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb* 54, 108-116
 - USDA-United States Department of Agriculture 2010. http://www.pecad.fas.usda.gov/cropexplorer/cropview/CommodityView.cfm%3Fcropid%40440000Yselected_year%2010Yrankby%24Exports. <http://www.fas.usda.gov/htp/CP2011/Corn-2011-Final.pdf>.
 - Vaamonde, G. 1996 Micotoxinas Capítulo VIII, en Toxicología de los alimentos. Silvestre A. Ed. Hemisferio Sur.
 - Venancio, A. y Paterson, R. 2007 The challenge of mycotoxins In A. McElhatton A. y Marshall R. (Eds.) *Food Safety—A Practical and Case Study Approach* Springer Berlin Germany pp. 24–47
 - Verma, J., Swain, B.K. y Johri, T.S. 2002 Effect of various levels of aflatoxin and ochratoxin A and combinations thereof on protein and energy utilisation in broilers. *J Sci Food Agric* 82, 1412-1417.
 - Wang, D., Liang, Y., Chau, N., Dien, L., Tanaka, T. y Ueno, Y. 1995 Natural co-occurrence of *Fusarium* toxins and aflatoxin B1 in corn for feed in North Vietnam. *Nat. Toxins* 3, 445–449
 - Wang, J-S., Kensler, T. y Groopman, J. 1998 Toxicants in food: fungal contaminants. En: Ioannides C. (Ed.) *Current Toxicology Series: Nutrition and Chemical Toxicity*. Wiley, New York, p 29– 57
 - Wang, J-S. y Groopman, J. 1999 DNA damage by mycotoxins. *Mutation Res* 424, 167–181
 - Watts, C., Chen, Y., Ledoux, D., Broomhead, J., Bermudez, A. y Rottingaus, G. 2003 Effects of multiple mycotoxins and a hydrated sodium calcium aluminosilicate in poultry. *Int J Poult Sci* 2, 372–378
 - Wheeler, K., Hurdman, B. y Pitt, J. 1991 Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *Int J Food Microbiol* 12, 141–150
 - Wild, C., Pionneau, F., Montesano, R., Mutiro, C. y Chetsanga, C. 1987 Aflatoxin detected in human breast milk by radioimmunoassay. *Int J Cancer* 40, 328-333

- Wild, C., Shrestha, S., Anwar, W. y Montesano, R. 1992 Field studies of aflatoxin exposure, metabolism and induction of genetic alterations in relation to hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma in the Gambia and Thailand. *Toxicol Lett* 64-65, 455-461
- Wild, C. y Hall, A. 2000 Primary prevention of hepatocellular carcinoma in developing countries. *Mutat Res* 46, 381-393
- Wild y Turner. 2002 The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis* 17, 471-481
- Williams, J., Phillips, T., Jolly, P., Stiles, J., Jolly, C. y Aggarwal, D. 2004 Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr* 80, 1106-1122
- Wilson, M. 2005 Microbial inhabitants of humans, their ecology and role in health and disease. Chap.7: The gastrointestinal tract and its indigenous microbiota. Cambridge University Press. p.: 252 – 317.
- Wogan, G., Kensler, T. y Groopman, J. 2012 Present and future directions of translational research on aflatoxins and hepatocellular carcinoma. A review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 29, 249-257
- Xu, X. y Berrie, A. 2005 Epidemiology of mycotoxigenic fungi associated with *Fusarium* ear blight and apple blue mould: a review. *Food Addit Contam* 22, 290-301.
- Yang, Y., Shevchenko, A., Knaust, A., Abuduresule, I., Li, W., Xingjun, H., Changsui, X., Wang, Ch. y Shevchenko, A. 2014 Proteomics evidence for kefir dairy in Early Bronze Age China. *J Archaeol Sci* 45, 178-186
- Zacconi, C., Parisi, M., Sarra, P., Dallavalle, P. y Botazzi, V. 1995 Competitive exclusion of *Salmonella kedougou* in kefir fed chicks. *Microbial Alim Nut* 12, 387-390
- Zajsek, K. y Gorsek, A. 2010 Mathematical modeling of ethanol production by mix kefir grains yeast population as a function of temperature variations. *Biochem Engin J* 49, 7-12
- Zhang, X. y Ohta, Y. 1990 Antimutagenicity and binding of lactic acid bacteria from a Chinese cheese to mutagenic pyrolyzates. *J Dairy Sci* 73, 2702 – 2710
- Zhang, X. y Ohta, Y. 1991 *In vitro* binding of mutagenic pyrolyzates to lactic acid bacterial cells in human gastric juice. *J Dairy Sci* 74, 752 – 757

- Zhang, X.B. y Ohta, Y. 1993 Antimutagenicity of cell fractions of microorganisms on potent mutagenic pyrolyzates. *Mutat Res* 298, 247–253
- Zhang, Y., Liu, Y., Bao, Y. y Zhang, H. 2010 Influence of pH, heat and enzymatic treatments on the activity of antibacterial substance in MRS and milk media produced by *Lactobacillus fermentum* F6. *Agric Sci China* 9, 911-920
- Zheng, M., Richard, J. y Binder, J. 2006 A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia* 161, 261-273
- Zourari, A. y Anifantakis, E. 1988. Le kéfir caracteres physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. Technologie de production. Une revue. *Le Lait* 68, 373-392.

ANEXO

ANEXO. Medios de cultivo y soluciones empleados

Medios y Caldos de Cultivo y soluciones para dilución.

Agar agua	
Agar agar (Britania, Buenos Aires, Argentina)	2 g/L
Agar Papa (PDA)[®] (BIOKAR DIAGNOSTICS, Beauvais, Francia)	
Extracto de papa	4 g/L
Glucosa	20 g/L
Agar	15 g/L
SNA (Spezieller Nährstoffarmer agar- Medio para favorecer la Esporulación)	
KNO ₃	1g/L
K ₂ HPO ₄	1g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g/L
KCl	0,5g/L
Glucosa (Carlo Erba [®] , Milán, Italia)	0,2g/L
Sacarosa (Carlo Erba [®] , Milán, Italia)	0,2g/L
Agar	15g/L
Agar MEA	
Extracto de levadura (DIFCO, Le Pont de Claix, Francia)	20 g/L
Extracto de malta (BIOKAR, Beauvais, Francia)	10 g/L
Agar (Britania, Buenos Aires, Argentina)	15g/L
Agar YCG[®] (BIOKAR, Beauvais, Francia)	
Extracto de levadura	5 g/L
Glucosa	20 g/L
Cloramfenicol	0,1 g/L
Agar	15 g/L

Caldo MRS[®] (DIFCO, Le Pont de Claix, Francia)	
Peptona	10
Extracto de carne	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
Glucosa	20 g/L
Polisorbato 80	1 g/L
Citrato de amonio	2 g/L
Acetato de sodio	5 g/L
MgSO ₄	0,1 g/L
MnSO ₄	0,05 g/L
K ₂ HPO ₄	2 g/L
Agua de peptona para dilución	
Peptona	1g/L
Solución dispersante de esporas	
Lauril sulfato de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania)	0,1 g/L
Glucosa (Carlo Erba [®] , Milán, Italia)	10,0 g/L

Todos los medios de cultivo y soluciones se prepararon en agua destilada y se esterilizaron en autoclave a 120°C por 15 minutos.

Soluciones colorantes

Solución colorante de conidios	
Azul de Tripán (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)	4g/L
Buffer fosfato salino (Merck, Darmstadt, Alemania)	

El azul de tripan se disolvió en solución buffer fosfato al 1/50 y se filtró en filtro Whatman.

Tinción de Gram

Esta tinción se utilizó para comprobar la pureza de los cultivos microbianos (Gram 1884; Smith and Hussey 2005).

Medios utilizados para cultivo de células.

Ingrediente	D-MEM Completo (1)	D-MEM Completo (2)	D-MEM Adhesión
DMEM^a	1 sobre	1 sobre	1 sobre
Penicilina/estreptomicina (1000 IU, 1000 µg/mL)^b	13 mL	13 mL	-
Aminoácidos no esenciales^c	13 mL	13 mL	-
Gentamicina (50 mg/mL)	10 mL	10 mL	-
NaHCO₃	2,0 g	2,0 g	2,0 g
L-glutamina	0,3 mg	0,3 mg	-
Suero fetal bovino inactivado^d	120 mL	180 mL	-
Agua miliQ	1000 mL	1000 mL	1000 mL
pH	7,5 ± 0,1	7,5 ± 0,1	7,5 ± 0,1

^a Dulbecco Modified Eagle's Medium, GIBCO, Grand Island N.Y., USA; ^b GIBCO, Grand Island N.Y., USA; ^c MEM Non-essential amino acids solution (100X), GIBCO, Grand Island N.Y., USA; ^d BIOSER, Argentina. El suero fue inactivado térmicamente, incubándolo 30 minutos a 60 °C. El D-MEM (1) se utilizó para las células HepG2 y el D-MEM (2) se utilizó para las células Caco-2TC7.