



2018

**Desarrollo de una mezcla microbiana
para la inclusión como probiótico en la
industria avícola.
Estudio de su acción sobre hongos
contaminantes y micotoxinas**

M.Sc Mariana Correa Franco
Directora: Graciela De Antoni
Codirectora: Ángela León Peláez



Facultad de Ciencias Exactas | UNLP





UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

**Desarrollo de una mezcla microbiana para la inclusión
como probiótico en la industria avícola. Estudio de su
acción sobre hongos contaminantes y micotoxinas**

Tesista: Mariana Correa Franco

Directora: Graciela De Antoni

Codirectora: Ángela León Peláez

Año: 2018



El presente trabajo, para optar por el grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue desarrollado en la Cátedra de Microbiología, bajo la dirección de las Dras. Graciela De Antoni y Ángela María León Peláez.

Este trabajo se realizó con la colaboración de:

- La Universidad Nacional de La Plata, Facultad de ciencias exactas, departamento de biológicas, por el espacio brindado para la formación y desarrollo de las actividades de investigación.
- El Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haberme otorgado la becas, con la cuales pude desarrollar el presente trabajo.
- El Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Estación Experimental Agropecuaria Concepción del Uruguay donde se desarrollaron parte de los trabajos experimentales.
- Las Doctoras Graciela De Antoni y Ángela León Peláez que dirigieron y gestaron este trabajo.
- El Dr Dante Bueno, MSc Mario Alberto Soria, MSc Francisco Federico, Dra Claudia Galliner, la Lc Carolina Venninni y MV Roberto Zapata, que fueron quienes me acompañaron en los estudios *in vivo* en pollos parrilleros.
- Las Dras Fernanda Hamet, Micaela Medrano y al Lc. Mariano Malamud, que con su conocimiento y compañía aportaron en los experimentos de biología molecular.
- Los Dr Pablo Perez y Dr Fernando Trejo, que acompañaron el desarrollo del modelo *in vivo* de ratones.
- La Lc Carina Tersigni de Laboratorio de Salud Publica, Exactas-UNLP, quien presto su tiempo y conocimiento en los análisis bioquímicos.
- La Dra Sonia Keunchkarian del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos (LIDMA), quien con mucha dedicación colaboró con la puesta a punto de las medidas en el HPLC.

Agradecimientos

Este proyecto personal de formación me permitió entender que no existe posibilidad de realizar ningún trabajo, sueño o proyecto en soledad, la ciencia no se construye en un laboratorio ni con un guardapolvo, se construye en las horas de discusión, de análisis, en los almuerzos con los compañeros e incluso en la diferencia con el otro. Entender eso permite que el conocimiento y sobre todo el deseo de conocer abra caminos y nos permita seguir creciendo, como personas, como profesionales y además como sociedad.

Durante cuatro años pase más tiempo en el laboratorio que en cualquier otro lugar y tuve la maravillosa experiencia coincidir con grandes personas, estaré agradecida por siempre haber encontrado un mano amiga y una palabra de aliento en los momentos difíciles.

A ustedes queridos compañeros del Laboratorio de la Cátedra de Microbiología, por la compañía, los almuerzos, las discusiones y el cariño; a los compañeros de Microbiología – CIDCA, les agradezco el compañerismo y buena predisposición.

Guardo un agradecimiento especial a mi familia, que a la distancia apoyaron, impulsaron y potenciaron mi trabajo. A mis amigas, que hoy son como hermanas, con la compañía y amor de ellas me enfrentaría a cualquier otro reto en la vida.

Estaré agradecida siempre por el amor recibido.

Este logro está dedicado a mi querido Sebastián Botero, que no llego a verlo finalizado, pero fue quien nunca dudo de que lo lograría.

Índice

Introducción general	1
1. Hongos filamentosos	3
2. Micotoxinas	5
2.1 Aflatoxinas	7
3. Contaminación por hongos y micotoxinas en la industria avícola	10
4. Técnicas de control fúngico en alimentos	12
5. Detoxificación de los alimentos contaminados con micotoxinas	13
5.1 Métodos físicos	14
5.2 Métodos químicos	15
5.3 Métodos biológicos	16
6. Métodos de estudio de metabolismo y absorción de xenobióticos	17
6.1. Modelos de estudio del metabolismo de los xenobióticos	18
7. El kefir y su capacidad antimicrobiana	21
7.1 Microorganismos aislados de kefir	24
8. Permeado de suero (PS)	25
8.1 Permeado de suero como sustrato de la fermentación	25
9. Justificación del estudio	29
<hr/>	
Materiales y Métodos	
1. Gránulos de kéfir y microorganismos aislados de kefir empleados.	31
Condiciones de crecimiento	
1.1 Obtención permeado de suero fermentado con <i>Lactobacillus plantarum</i>	31
1.2 Obtención permeado de suero fermentado con granulo AGK1	32

1.3 Medida del cambio de biomasa de los gránulos de kefir y de pH en el producto fermentado.	33
1.4 Cinéticas de pH del permeado de suero fermentados con cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> y gránulos CIDCA AGK1	35
1.5 Determinación y cuantificación de ácidos orgánicos en el permeado de suero fermentado con <i>Lactobacillus plantarum</i> y con gránulos AGK1	35
1.5.1 Cálculo de la concentración de ácidos orgánicos no disociados en el permeado de suero fermentado con <i>Lactobacillus plantarum</i> y gránulos AGK1	36
2. Hongos empleados	36
2.1 Condiciones de crecimiento de los hongos	37
2.2 Identificación molecular de los hongos por método de secuenciación	37
2.2.1 Ruptura celular y obtención del ADN purificado.	37
2.2.2 Amplificación del ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	38
2.2.3 Ciclo para la Reacción en Cadena la Polimerasa (PCR)	38
2.2.4 Secuenciación	40
2.3 Capacidad antifúngica de las cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> seleccionados y del granulo CIDCA AGK1 sobre los hongos seleccionados e identificados.	40
2.3.1 Inhibición fúngica por sobrecapa	40
2.3.2 Reducción de la germinación de los conidios (%RG)	41
2.3.3 Determinación del efecto del permeado fermentado (<i>L. plantarum</i> o CIDCA AGK1) sobre las características de crecimiento de los hongos.	42
2.4 Capacidad de captura de AFB1 de la fracción microbiana del granulo CIDCA AGK1 (FMK) y de <i>Lactobacillus plantarum</i> seleccionados	43
2.5 Estudio de la capacidad de protección de la FMK y de <i>Lactobacillus</i>	44

plantarum seleccionados frente al modelo celular HepG2	
2.5.1 Cultivo celular HepG2	44
2.5.2 Determinación del daño de las células HepG2 frente a la exposición a aflatoxina B1	45
2.5.3 Determinación de la capacidad de protección de FMK y <i>Lactobacillus plantarum</i> seleccionados frente al daño por AFB1 en el modelo celular HepG2	45
3. Administración de los microorganismos a pollos parrilleros	46
3.1 Resistencia de los microorganismos	46
3.1.1 Resistencia a la condiciones gastrointestinales de las cepas <i>Lactobacillus plantarum</i> y la FMK	48
3.1.2 Resistencia bacteriana al agua con diferentes concentraciones de cloro	48
3.2 Ensayos <i>In vivo</i>	50
3.3 Animales empleados	52
3.4 Parámetros productivos y factor de eficiencia productiva (FER)	52
3.5 Contenido de humedad y grasa en hígado	52
3.6 Análisis de la translocación de microorganismos en hígado y bazo	53
3.7 Recuento diferencial de leucocitos	53
3.8 Análisis bioquímico de suero	53
3.9 Análisis histopatológico de intestino e hígado	54
3.10 Análisis de diversidad microbiana del contenido cecal mediante Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)	54
3.10.1 Obtención de ADN a partir de contenido intestinal y materia fecal	55
3.10.2 Determinación de la concentración de ADN	55
3.10.3 Amplificación del ADNr 16S	56

3.10.4 Electroforesis en gel de acrilamida con gradiente desnaturalizante (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)	56
--	----

4. Análisis estadístico	59
-------------------------	----

Capítulo I

Fermentación de permeado de suero por microorganismos de kefir	61
---	----

Introducción	63
--------------	----

Objetivos	65
-----------	----

Resultados y discusión	67
------------------------	----

1. Selección, fermentación y crecimiento de microorganismos aislados de kefir en permeado de suero	67
--	----

1.1 Crecimiento y recuentos de las cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> seleccionadas	68
--	----

1.2 Cinética de acidificación del permeado de suero fermentado con cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i>	75
--	----

1.3 Determinación de ácidos orgánicos por cromatografía líquida de alta eficacia (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)	78
---	----

1.4 Capacidad de fermentación y producción de biomasa del gránulo CIDCA AGK1 en permeado de suero.	82
--	----

1.4.1 Cinética de acidificación y concentración de ácidos orgánicos del permeado de suero fermentado con gránulos CIDCA AGK1	82
--	----

1.4.2 Cálculo de la concentración de ácidos orgánicos no disociados	86
---	----

1.4.3 Capacidad de incremento de la biomasa del gránulo CIDCA AGK1 en	88
---	----

Permeado de Suero	
Conclusiones	94

Capítulo II	
Potencial antifúngico del Permeado de suero fermentado con Lactobacillus plantarum y gránulos de kefir CIDCA AGK1	95

Introducción	97
Objetivos	101
Resultados y discusión	103
1. Selección de hongos e identificación a nivel molecular por secuenciación	103
2. Capacidad antifúngica de Lactobacillus plantarum y los sobrenadantes libres de células de PS fermentado con Lactobacillus plantarum y el granulo CIDCA AGK1	110
2.1 Inhibición fúngica por <i>L. plantarum</i> mediante técnica de sobrecapa	110
2.2 Porcentaje de la reducción de la germinación fúngica (%RG) en presencia de sobrenadantes libres de células obtenidos por fermentación de PS con <i>L. plantarum</i> o gránulo CIDCA AGK1	113
2.3 Reducción del tiempo de latencia (Lag) y la velocidad de crecimiento (KD) fúngica en presencia de sobrenadantes libres de células obtenidos por fermentación de PS con <i>L. plantarum</i> y gránulo CIDCA AGK1	119
3. Capacidad de protección y captura de aflatoxina B1 (AFB1) por Lactobacillus plantarum y la fracción microbiana del gránulo CIDCA AGK1 (FMK)	131
3.1 Determinación del daño de las células HepG2 frente a la exposición a aflatoxina B1 (AFB1)	131

3.2. Efecto sobre la citotoxicidad causada por aflatoxina AFB1 en células HepG2 mediante la utilización de Lactobacillus plantarum y la fracción microbiana obtenida de los gránulos de kefir CIDCA AGK1 (FMK).	135
3.2 Capacidad de captura de AFB1 por Lactobacillus plantarum y la fracción microbiana obtenida de los gránulos de kefir CIDCA AGK1 (FMK)	138
Conclusiones	144

Capítulo III

Administración de cepas probióticas de kefir y sus productos fermentados a pollos parrilleros	145
--	-----

Introducción	147
Objetivos	151
Resultados y discusión	153
1. Estudios previos a la administración de los microorganismos	153
1.1 Resistencia de los microorganismos al cloro libre en agua potable	153
1.2 Resistencia a las condiciones gastrointestinales	155
1.3 Evaluación de los parámetros productivos en pollos parrilleros	158
2. Peso de hígado y análisis proximal.	162
3. Peso de bolsa de Fabricio y bazo	165
4. Translocación de microorganismos	167
5. Recuento diferencial leucocitario	168
6. Parámetros bioquímicos	171
7. Análisis histopatológico de hígado y duodeno	176
7. Análisis de diversidad microbiana mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)	178

Conclusiones	183
Conclusiones Generales	185
Referencias bibliográficas	187
Anexos	225
Estudios complementarios	

Introducción general

El objetivo de este trabajo fue evaluar la potencialidad probiótica de un grupo de microorganismos obtenidos del kefir en pollos parrilleros. El kefir es un producto ancestral y natural con comprobada acción probiótica en humanos. Para este fin se planteó el uso de permeado de suero como sustrato de fermentación de los microorganismos seleccionados. Previo a los ensayos *in vivo* se realizaron estudios *in vitro* de los microorganismos seleccionados y el permeado de suero fermentado con los mismos. Se analizó la capacidad antifúngica, tanto de los microorganismos como de permeado de suero (PS) fermentado por éstos, contra hongos aislados en distintas etapas la cría de pollos parrilleros. Se probó la capacidad de los microorganismos estudiados en la protección de una línea celular, frente a la acción tóxica de la aflatoxina B₁. Para finalizar los ensayos *in vitro* se comprobó la capacidad de los microorganismos de capturar AFB₁ en diferentes concentraciones. Una vez probados todos los desafíos *in vitro*, tanto el PS fermentado como las cepas se suministraron a pollos parrilleros, comprobando que tienen efectos benéficos y son cepas inocuas para las aves.

1. Hongos filamentosos

La contaminación de alimentos con hongos filamentosos y levaduras es causa de grandes pérdidas económicas en la industria alimentaria en todo el mundo, se estima que del 5 al 10% de la producción mundial de alimentos se pierde debido a contaminación fúngica (Pitt & Hocking 2009). Muchos hongos son reconocidos agentes de deterioro y pueden alterar las características organolépticas de los alimentos. Desde el punto de vista sanitario, algunos de ellos producen esporas que generan reacciones alérgicas en el hombre y animales (Simon-Nobbe et al. 2008; Woolnough et al. 2015). Otros presentan la capacidad de producir una gran variedad de metabolitos secundarios denominados micotoxinas. Los hongos productores de micotoxinas se encuentran muy difundidos en el ambiente y resultan ser contaminantes frecuentes de los alimentos (Pitt & Hocking 2009).

Los hongos filamentosos presentan una gama óptima de temperatura de crecimiento que se encuentra entre 28 y 37 °C y pueden crecer en un amplio rango, el cual se extiende entre 12 y 48 °C. Se presentan en la naturaleza bajo la forma de micelio o conidios. Bajo condiciones adversas tales como desecación o escasez de nutrientes, forman estructuras de resistencia. De este modo permanecen latentes

hasta que las condiciones ambientales cambian y se hacen favorables; es entonces cuando las esporas germinan dando nuevo micelio (Yu et al. 2005).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que hasta el 25% de los productos agrícolas del mundo están contaminados con hongos y/o con micotoxinas, que conducen a pérdidas económicas significativas, por este motivo la contaminación de alimentos para humanos y animales con micotoxinas es un problema mundial. Las especies de hongos más importantes implicadas en la contaminación y producción de micotoxinas en alimentos de humanos y animales son *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* (Jørgensen 2007; Srour et al. 2017). *Aspergillus* y *Penicillium* se encuentran generalmente como contaminantes en alimentos durante el secado y almacenamiento, mientras que las especies de *Fusarium* y *Alternaria* spp pueden producir micotoxinas antes o después de la cosecha (Cast 2003).

Son numerosos los factores que pueden influir en la contaminación de alimentos con hongos productores de micotoxinas, entre estos están la resistencia genética del cultivo, las condiciones climatológicas caracterizadas por temperaturas y humedades relativas altas, condiciones de transporte y almacenamiento inadecuado y un secado deficiente (Food and Drug Administration 2009). Por tanto, la contaminación del producto puede ocurrir en cualquier punto de la cadena alimenticia, desde la cosecha, pasando por la recolección, almacenaje, transporte, elaboración y conservación (Kabak, et al. 2006). Sin embargo, la presencia de esporas de estos hongos en un alimento no implica necesariamente la presencia de micotoxinas, sino que indica un riesgo potencial de contaminación. Asimismo, se debe tener en cuenta que las diferentes cepas de una especie difieren en su capacidad de producir micotoxinas y es común encontrar cierta proporción de aislamientos de cepas no toxigénicas. Por otra parte, la ausencia de hongos toxigénicos no garantiza que el alimento esté libre de micotoxinas, pues las toxinas pueden persistir aún cuando el hongo haya perdido su viabilidad (Kana et al. 2013; Perrone & Gallo 2017; Vaamonde 1996).

La implementación de buenas prácticas agrícolas de los cultivos, así como las técnicas de cosecha adecuadas y las condiciones de almacenamiento correctas

son fundamentales para reducir la contaminación con hongos de las semillas y cereales. Por otro lado, tanto los métodos de procesamiento como los de preservación pueden utilizarse para controlar el desarrollo de hongos en alimentos y, en consecuencia, evitar la formación de micotoxinas

2. Micotoxinas

Se sabe que existen aproximadamente 400 metabolitos secundarios con potencial toxigénico producidos por hongos contaminantes (Sweeney & Dobson 1999). Estos metabolitos secundarios son conocidos como micotoxinas y se generan cuando la fase de crecimiento del hongo llega a su etapa final y durante la fase estacionaria, siendo a menudo asociado con la diferenciación y la esporulación. Son moléculas relativamente pequeñas con un peso molecular menor a 700 Da. La mayor parte de estos metabolitos secundarios se originan en la ruta policetónica. Sin embargo, existe un pequeño número de especies fúngicas capaces de sintetizar micotoxinas mediante rutas biosintéticas más complejas (Moss, 1991).

Las micotoxinas constituyen un problema a nivel mundial por su alta incidencia y niveles de ocurrencia en alimentos para humanos y animales. Antes de la cosecha, el riesgo de desarrollo de micotoxinas es mayor durante los períodos de sequía, dado que cuando la humedad está debajo del valor normal y la temperatura es alta, el número de esporas fúngicas en el aire aumenta y éstas infectan las cosechas a través los insectos (Christensen 1987; Vega 2008). Durante la fase de post-cosecha, la proliferación de hongos y producción de micotoxinas puede aumentar en sitios de almacenamiento calientes y húmedos (Torres et al. 2014; Villers 2014). Una micotoxina se considera “importante” si se ha demostrado su capacidad de provocar efectos adversos considerables en varios países (FAO/OIEA, 2003). Las micotoxinas que tienen mayor importancia desde el punto de vista agroalimentario son las aflatoxinas (B, G y M), la citrinina, las fumonisinas (especialmente FB₁), la ocratoxina A, la patulina, los tricotecenos (DAS, T-2, HT-2, NEO, DON, NIV y fusarenona X) y la zearalenona. Según la FAO los hongos micotoxigénicos de mayor importancia a nivel mundial son los que se muestran en la tabla 1.

Tabla1: Hongos y sus micotoxinas de importancia mundial

Especie	Micotoxina que produce
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas B ₁ , B ₂
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	T-2 toxin
<i>Fusarium graminearum</i>	Deoxynivalenol (o nivalenol)
	Zearalenona
<i>Fusarium moniliforme (F. verticillioides)</i>	Fumonisina B ₁
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ochratoxina A
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ochratoxina A

FAO Mycotoxins of world-wide Importance
<http://www.fao.org/docrep/005/y1390e/y1390e04.htm>

La enfermedad resultante de la exposición a las micotoxinas se denomina micotoxicosis (Richard et al. 2003). Entre las micotoxinas involucradas en las micotoxicosis se encuentra el alcaloide del ergot que produce ergotismo cuyo hongo productor es *Claviceps purpurea* (Grm et al. 1980; Schiff 2006; Tudzynski et al. 1999). Las aflatoxinas producen aflatoxicosis siendo producidas por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. bonius*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. ochraceus* y *A. australis* y *A. minisclerotigenes* (Fraga et al. 2007; Guimarães et al. 2018; Kana et al. 2013; Pildain et al. 2008). La ocratoxina A es una micotoxina que genera la ocratoxicosis es producida por *A. ochraceus*, *A. niger* y *Penicillium verrucosum* (Fraga et al. 2007; Perrone & Gallo 2017; Zohri et al. 2017). La zearalenona produce hiperestrogenismo y es producida por *Fusarium graminearum* y *F. culmorum*. Los tricotecenos producen fusariotoxicosis y son producidos por *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum* y *F. poae*. La toxina T-2 produce una

enfermedad denominada leucopenia tóxica alimentaria y es generada por *F. sporotrichioides* y *F. poae* (Cabañes et al. 2002; Jurado et al. 2005).

Hasta ahora, las micotoxinas identificadas muestran, incluso en baja concentración, propiedades carcinógenas, mutagénicas (Stark 2001; Urrego & Díaz 2006), teratogénicas e inmunosupresoras (Hsieh et al. 1988), hepatóxicas, nefrotóxicas y neurotóxicas (Robert et al. 2017; Sell 2003). Los efectos tóxicos de las micotoxinas son muy variados, de la misma forma que lo son sus estructuras químicas. Para cada toxina existe un órgano primariamente afectado. Así, el órgano blanco de las aflatoxinas es el hígado, para la ocratoxina y la citrinina es el riñón, para la toxina T-2 es el sistema inmunológico y las mucosas, para el deoxinivalenol es la mucosa intestinal y para la zearalenona es el tracto urogenital (Fernandez Pinto et al. 2008; Müller et al. 1999; Oliver et al. 2012).

Si bien todas las micotoxinas son de interés, 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, semillas, maíz y el maní (International Agency for Research on Cancer 2002, 2012, 2015)

2.1 Aflatoxinas

Las aflatoxinas fueron descubiertas en la década de 1960, luego de provocar un brote (*Turkey X disease*) altamente letal en pavos en Inglaterra. En dicho brote, miles de aves murieron después de consumir alimento balanceado conteniendo torta de cacahuets. El principal hongo encontrado en la torta de cacahuets fue *Aspergillus flavus*, dándole el nombre a esta toxina (Bradburn et al. 1994).

En mamíferos la exposición a las aflatoxinas comienza en el útero como resultado de la transmisión de toxinas a través de la placenta, continúa en el período pos-natal con la alimentación materna (Wild et al. 1996) y a lo largo de la vida del individuo si la exposición a éstas es crónica (Jeannot et al. 2012; Williams et al. 2004). 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 (Williams et al. 2004). Además, las aflatoxinas son hepatocarcinógenos potentes en primates no humanos, roedores, peces y aves (Arana et al. 2014; Fetaih et al. 2014; Monson et al. 2014; Troxel et al. 1997).

Las aflatoxinas son inodoras, insípidas e incoloras. Químicamente, son estables en los alimentos y resistentes a la degradación bajo procedimientos de cocción normales. Es difícil eliminarlas una vez que se producen (Goldman & Shields 2003 Stark 2001; Srour et al. 2017). Las aflatoxinas pertenecen a la familia de las difuranocumarinas, su estructura química se muestra en la figura 2.

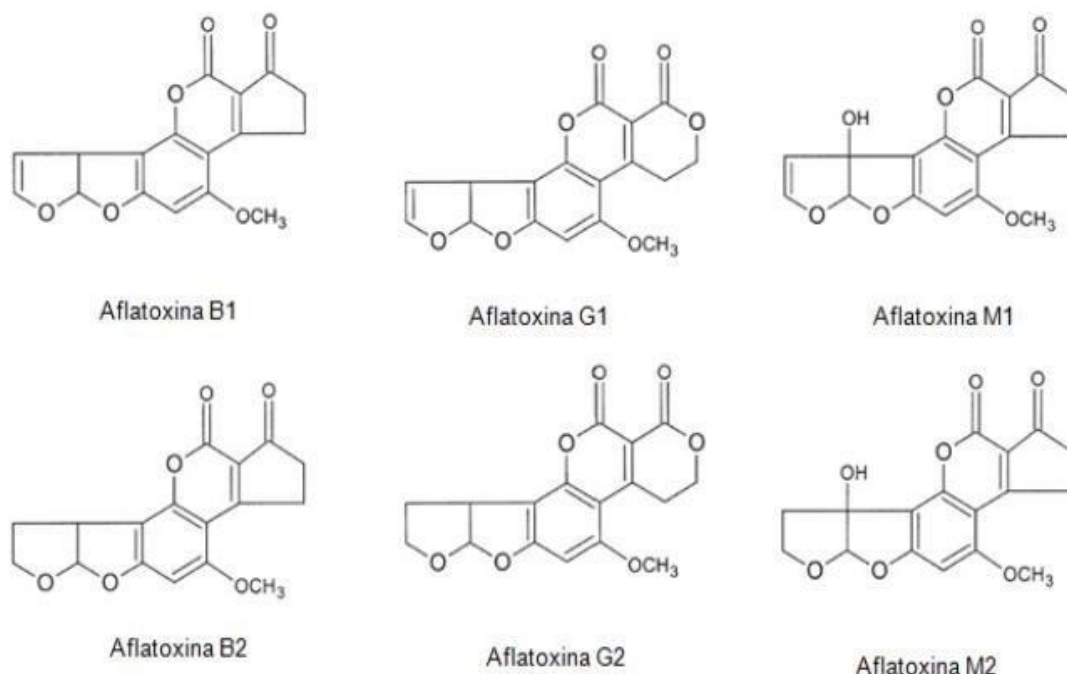


Figura 2: Estructura química de las aflatoxinas (Urrego & Díaz 2006)

Las aflatoxinas M_1 y M_2 son respectivamente productos hidroxilados del metabolismo oxidativo de las aflatoxinas B_1 y B_2 ; éstos metabolitos pueden pasar a la leche en las glándulas mamarias (tanto en humanos como en animales) (Rastogi et al. 2004). Las aflatoxinas B_2 , G_1 y G_2 son menos frecuentes y casi nulas en ausencia de aflatoxina B_1 (AFB_1). Las aflatoxinas pueden causar toxicidad aguda y crónica en los animales (Jeannot et al. 2012; Reddy et al. 2006; Sharma & Farmer 2004; Viegas et al. 2012).

La AFB₁ está clasificada por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) como uno de los carcinógenos más potentes conocidos (IARC, 2012). 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-epóxido-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, específicamente se ha encontrado una mutación puntual en la tercera posición del codón 249 en el exón 7 del gen TP53, que corresponde a una transversión G:C→T:A. Esta mutación origina el cambio del aminoácido arginina por serina (mutación 249ser), alterando el dominio de unión de la proteína p53 al ADN (Chittmitrapap et al. 2013; Gratz 2007; Stark 2001)

Los efectos tóxicos de AFB₁ en el hígado son una serie de alteraciones en el metabolismo de proteínas, carbohidratos y lípidos así como la aparición de necrosis de los hepatocitos y de otras células activas metabólicamente (Adedara et al. 2010; Cheng et al. 2017; Del Bianchi et al. 2005). La AFB₁ 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 (Hsieh et al. 1988; Massey et al. 1995; Troxel et al. 1997; Wild et al. 1996). 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 (Liu et al. 2014).

La susceptibilidad a las aflatoxinas varía de acuerdo con la edad, el sexo, las especies animales y las toxinas involucradas. De acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas y las especies animales involucradas (Kabak & Dobson 2006). Las aves de corral son los animales de granja más sensibles a los efectos tóxicos de

incluso pequeñas cantidades de AFB₁ (Del Bianchi et al. 2005; Galarza-Seeber et al. 2016).

3. Contaminación por hongos y micotoxinas en la industria avícola

La industria avícola se ha convertido en una importante actividad económica en Argentina. De acuerdo a las cifras aportadas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, en los últimos años en Argentina se ha incrementado notablemente el consumo de carne de ave, el consumo aparente total de carne aviar registrado durante el año 2017 aumentó 7% en relación con el mismo período del año 2016. Por su parte, el consumo *per cápita* alcanzó 44,55 kg/persona/año, aumentando 7% respecto a enero-mayo de 2016 (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca 2017). Debido a este incremento y a la diversificación de la oferta de productos se han producido avances tecnológicos en los últimos años, tales como mejoras genéticas, automatizaciones, planes sanitarios entre otros. En la producción del pollo parrillero, éste alcanza en sólo 50 días el peso requerido para la faena, con 2,7 kg y una conversión alimentaria de alrededor de 1,6 kg de alimento/kg de carne (Blajman et al. 2015). Para satisfacer la demanda actual los pollos parrilleros son sometidos a sistemas de crianza intensivos en confinamiento. En esos sistemas, los pollos parrilleros están expuestos diariamente a diversos factores de estrés que impiden desarrollar todo su potencial productivo (Chiappe 2010; Díaz et al. 2007) .

La producción intensiva de pollos, ya sea de postura o de engorde implica grandes densidades de animales en áreas pequeñas, esto involucra contaminación del aire que puede constituir un peligro considerable para la salud de las aves, los agricultores y las personas que viven cerca de la granja (Shokri 2016; Skóra et al. 2016; Viegas et al. 2012). Por otro lado, la diseminación de aerosoles biológicos fuera de las casas de los animales puede resultar en contaminación ambiental local o incluso más extensa (Arné et al. 2011). La microbiota en el aire interior de los lugares de cría de pollos contiene hongos de los géneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis* y *Trichophyton* (Lugauskas et al. 2004). Estos hongos y sus micotoxinas pueden causar una serie de trastornos en aves y criadores de aves de corral, principalmente en el tracto respiratorio

(irritación de las membranas mucosas, micosis invasivas de los pulmones, rinitis alérgica, alveolitis alérgica pulmonar, asma) y en la piel (dermatomicosis y onicomosis) (Schenker et al., 1998).

El género *Aspergillus* ha cobrado un especial interés en la cría de pollos. La aspergilosis es la enfermedad micótica más común en las aves, afecta el sistema respiratorio con lesiones observadas en los alvéolos y pulmones de una amplia variedad de especies de aves (Arné et al. 2011). Los casos clínicos de aspergilosis han sido diagnosticados en pollos, pavos, avestruces, ñandúes, pingüinos y gansos (Monson et al. 2014; Perelman & Kuttin 1992; Xavier et al. 2007; Ziółkowska et al. 2014). La presencia de conidios en el sistema respiratorio puede causar la colonización, lo que ha permitido el aislamiento fúngico a partir de tejido pulmonar (Arné et al., 2011). *Aspergillus fumigatus* es el principal agente etiológico responsable de las aspergilosis. Otra de las patologías asociadas a la contaminación fúngica es la espondeilitis, común en los pollos de engorde, que afecta a la primera vértebra cervical o la primera vértebra torácica, causada también por *A. fumigatus*, lo que resulta en una parálisis anterior parcial en pollos de engorde (Spanamberg et al. 2016; van Veen et al. 1999).

En Argentina se ha estudiado desde hace algunas décadas atrás la presencia de hongos filamentosos y micotoxinas en maíz y en alimento para aves (Barros et al. 2009; Dalcero et al. 1997; Magnoli et al. 2011). En la provincia de Córdoba se encontró entre los hongos con mayor prevalencia los pertenecientes a los géneros *Aspergillus* spp (85%) y *Fusarium* spp (70%). Del género *Aspergillus* la especie identificada con mayor frecuencia fue *A. flavus* y la micotoxina más significativa fue AFB₁ presente en un 48%, seguida por la zearalenona (ZEA) (Magnoli et al. 2002; Monge et al. 2012). El maíz es una materia prima fundamental en la alimentación aviar; en Argentina se producen entre 40 y 35 millones de toneladas anuales de maíz (Bolsa De Cereales, Departamento De Estimaciones Agrícolas, 2018). En la actualidad, el 78,3% de la producción de maíz se destina a la exportación y el 21,7% restante se consume en el país. De ese total, el 80% lo utiliza la industria avícola (SENASA, 2018). 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, entre las que

se encontraron altos niveles de ZEA y DON, fumonisinas y aflatoxinas (Garrido et al. 2012).

Las aflatoxinas constituyen una gran preocupación para la producción avícola. La toxicidad de las aflatoxinas en pollos de engorde ha sido ampliamente investigada por sus efectos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos e inhibidores del crecimiento (Andretta et al. 2012; Viegas et al. 2012). Las aflatoxinas también pueden causar importantes cambios macroscópicos y microscópicos en el hígado, como hepatomegalia, palidez, degeneración hidrópica, cambios grasos, hiperplasia del conducto biliar y fibrosis periportal (Del Bianchi et al. 2005), así como lesiones renales y del bazo, deterioro de la respuesta inmune humoral y celular (Fetaih et al. 2014; Sharma 1993) y una mayor susceptibilidad a algunos agentes ambientales e infecciosos. La contaminación y consumo de alimentos contaminados con AFB₁ no sólo implican grandes pérdidas económicas sino que se ha encontrado que aves de corral alimentadas con raciones contaminadas con AFB₁ en condiciones experimentales presentaron restos de AFB₁ en sus tejidos comestibles como el hígado y los músculos. Los residuos encontrados en diferentes estudios varían entre 3,0 a 250 ng de AFB₁/g de carne (Herzallah 2009; Hussain et al. 2010; Yang et al. 2012;). Estas variaciones de concentración de AFB₁ en los tejidos podrían estar influenciadas por diferentes factores incluidas las concentraciones de AFB₁ en la dieta, duración de la administración, edad, tipo de aves, entre otros (Hussein 2001; Yang et al. 2012).

Desde principios de la década de 1990 se han realizado estudios sobre estrategias basadas en adsorbentes para eliminar las micotoxinas de los alimentos contaminados y minimizar sus efectos sobre la salud de las aves de corral (Yiannikouris et al. 2001).

4. Técnicas de control fúngico en alimentos

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 (Alaniz Zanon et al. 2016; Chulze et al. 2015). En el caso del trigo, la aplicación de aislados de *Clonostachys rosea* redujo la colonización de la espiga por *Fusarium* (Palazzini et al. 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 et al. 2007).

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% (Fakruddin et al. 2015; Meronuck 1987; Reed et al. 2007). La temperatura del silo se establece en 14 °C, se deben airear los granos almacenados (Bogliachini, 2006) y aplicar fungicidas (Milus 1994).

5. Detoxificación de los alimentos contaminados con micotoxinas

El mejor método para controlar la contaminación de los alimentos por micotoxinas es la prevención. Pero cuando el producto ya está contaminado y será usado como alimento, es necesario eliminar o disminuir esta contaminación o su absorción en el organismo. La decontaminación de micotoxinas se refiere al tratamiento para remover, destruir o reducir el efecto tóxico de las toxinas en el alimento (Arroyo-manzanares et al. 2014).

La FAO estableció una serie de criterios para determinar si el proceso de descontaminación es apropiado o no, debiendo considerarse lo siguiente:

- Destruir, inactivar o eliminar la toxina.
- No producir residuos tóxicos o carcinogénicos en los productos finales o en alimentos obtenidos a partir de animales que se alimentaron de una dieta detoxificada.

- Mantener el valor nutritivo y la aceptabilidad del producto.
- No alterar las propiedades tecnológicas importantes de forma significativa.
- Destruir todas las esporas y micelios fúngicos para que no puedan, en condiciones favorables, proliferar y producir nuevas micotoxinas.

Las estrategias para prevenir la presencia de aflatoxinas y eliminar, inactivar o reducir su biodisponibilidad en alimentos contaminados incluyen métodos físicos, químicos y biológicos (Bueno et al. 2016; Richard et al. 2003; Kabak & Dobson 2006; Requena et al. 2005). La aplicación de estos métodos presenta algunas limitaciones que se refieren a la pérdida de calidad nutricional así como de las propiedades sensoriales de los alimentos. Por otra parte, en ocasiones, el costo del equipamiento necesario para la aplicación de estas técnicas así como la imposibilidad de garantizar los resultados deseados, hacen que los alimentos para alimentación humana y animal conserven la contaminación con aflatoxinas.

5.1 Métodos físicos

Los métodos físicos de separación y control de hongos contaminantes a menudo han sido usados por industrias para reducir los niveles de aflatoxinas, ya que estos granos están destinados al consumo humano. Entre los métodos físicos se incluyen la separación mecánica, la flotación, separación por color o remoción de los granos quebrados y lavado con soluciones después de la recolección de los granos. Probablemente, el método físico más empleado en una industria sea la separación de granos quebrados, lo cual permite reducir la contaminación por micotoxinas. Sin embargo, con frecuencia no se hace, debido a un concepto equivocado de utilizar al máximo los granos, sin pensar en los riesgos para la salud del consumidor (Pitt & Hocking 2009).

Las radiaciones, como los rayos X, son capaces de producir una emisión elevada de energía, la cual produce la ruptura de estructuras moleculares estables. Se ha establecido que las aflatoxinas AFB₁ y G₁ son más sensibles a los rayos X (Kabak, et al. 2006). La aplicación de altas temperaturas es un método poco eficiente durante este proceso de detoxificación, que afecta las vitaminas y proteínas del alimento (Zakhia-Rozis & Schorr-Galindo 2013).

5.2 Métodos químicos

La detoxificación de productos contaminados por inactivación a través de reacciones químicas, alta presión o extracción usando un solvente orgánico o una combinación de éstos, ha sido utilizada para el control de las aflatoxinas desde 1960. La utilización de amoníaco para la decontaminación de productos agrícolas contaminados por aflatoxinas ha demostrado ser muy eficiente. Sin embargo, su posterior utilización para alimento humano o animal es inadecuada debido a las alteraciones físico-químicas generadas (Norred et al. 1991).

Los agentes oxidantes como el ozono, peróxidos y permanganatos en solución alcalina son reactivos con los dobles enlaces no conjugados que se encuentran presentes en aflatoxinas y patulina. El ozono ha sido usado por décadas para esterilizar y preservar alimentos. El Departamento Administrativo de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA) ha establecido que el empleo de ozono es una metodología segura, GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Para ello, se dispone de una cámara donde se coloca el producto a tratar, el cual está provisto de un distribuidor vertical del gas ozono, de tal manera que se asegure una distribución homogénea sobre el producto. La reacción denominada ozonólisis genera nuevas moléculas más pequeñas, aunque algunos de los productos obtenidos pueden ser tóxicos (Karlovsky et al. 2016; Wang et al. 2016;).

El empleo de agentes químicos inertes como sustancias capaces de adsorber las moléculas de micotoxinas en su estructura también ha sido estudiado. Se destacan 2 grupos: los polímeros de polivinilpirrolidona y las arcillas, silicatos sintéticos. Los polímeros de pirrolidona forman puentes de hidrógeno y nitrógeno en su estructura. Los silicatos alumínicos pertenecen al grupo de las arcillas, que poseen una estructura tridimensional básica formada por la unión de tetraedros de SiO_4 , entre los cuales se intercalan otros iones como el aluminio. A diferencia de los silicatos alumínicos naturales, se desarrollaron los silicatos sódicos alumínico cálcico hidratados -HSCAS-, que poseen mayor capacidad de adsorción al ser productos refinados. El empleo de HSCAS en la alimentación animal resultó esencial para mejorar los parámetros sanitarios y productivos de aquellos

animales con problemas por contaminación con micotoxinas en el pienso (Borrell & Gimeno 2000; Miazzi et al. 2005; Rosa et al. 2001;)

En busca de nuevas alternativas de control con sustancias que sean inofensivas tanto para el hombre como para el ambiente, se están empleando compuestos de origen natural que tengan propiedades antifúngicas, como son los aceites esenciales. Estos se componen de mezclas complejas de hidrocarburos, compuestos oxigenados y residuos no volátiles, contenidos en glándulas o vesículas secretoras inmersas en los tejidos de las hojas, flores, corteza (pericarpio) y semillas de los frutos de algunas plantas. Entre los géneros que han sido utilizados para extracción de aceites esenciales están: *Thymus*, *Origanum*, *Syzygium*, *Mentha* y *Eucalyptus*, los cuales han presentado efectos antifúngicos y antibacteriales (Martínez-Romero et al. 2007; Serrano et al. 2008).

5.3 Métodos biológicos

Pitt & Hocking (2009) han descrito técnicas que permiten disminuir la producción de aflatoxinas en alimentos, usando la exclusión competitiva o inhibición competitiva. Para ello se contaminan el suelo o los granos con hongos como *A. flavus* o *A. parasiticus* no toxigénicos. El proceso de inhibición se logra porque los microorganismos no toxigénicos inoculados se desarrollan mejor sobre el sustrato, reduciendo el desarrollo de hongos micotoxigénicos (Abbas et al. 2006; Dorner & Horn 2007; Ehrlich 2014).

Otra forma de decontaminación ocurre durante el proceso fermentativo. En la producción de pan empleando granos de trigo contaminados con deoxinivalenol, se observó una reducción de los niveles de toxinas atribuida a la fermentación y al proceso térmico al cual fue sometido el producto. Esta decontaminación ocurre debido a que la levadura puede adsorber las toxinas presentes, reduciendo la contaminación (Shetty & Jespersen 2006).

Así mismo, se han usado bacterias endofíticas, como *Bacillus subtilis*, cuyo sistema enzimático reduce la acumulación de micotoxinas, ya que esta bacteria ocupa un lugar ecológico dentro de la planta de maíz y compite con hongos como *F.*

moniliforme, cuya estrategia funciona como un principio competitivo de exclusión (Bacon et al. 2001).

Se ha propuesto que la actividad antifúngica que se encuentra en los productos fermentados se debe no solamente a la presencia de algún ácido orgánico (producto de la fermentación) sino a una actividad sinérgica entre varios ácidos (Cortés-Zavaleta et al. 2014). Los microorganismos capaces de secuestrar aflatoxinas pueden considerarse probióticos y las bacterias más importantes pertenecen a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*.

6. Métodos de estudio del metabolismo de los xenobióticos

Los xenobióticos son sustancias químicas ajenas al sistema biológico, que pueden clasificarse en cuatro categorías: (1) sustancias naturales que superan el nivel normal de la dieta, como los nitratos, nitritos, metabolitos de nitratos; (2) metabolitos de origen natural producidas por hongos o plantas como las aflatoxinas, citrinas, ocratoxinas, patulina entre otras; (3) contaminantes del aire y del agua, mezclas químicas inorgánicas y orgánicas y (4) la categoría más grande: drogas, sustancias químicas agrícolas, pesticidas y fertilizantes, aditivos alimentarios, metales pesados, plastificantes y productos químicos industriales y domésticos (Chhabra 1979; Repetto 1995; Yousofshahi et al. 2015).

El metabolismo de los xenobióticos ha sido ampliamente estudiado y revisado (Haiser & Turnbaugh 2013; Repetto 1995; Yousofshahi et al. 2015). Está descrito que el metabolismo de los xenobióticos ocurre en tres fases. En la fase I se activa la sustancia química mediante la introducción de un grupo funcional reactivo y polar, mientras que en la Fase II se forman complejos entre la sustancia química original o su metabolito y un sustrato endógeno que generalmente da como resultado la conversión del compuesto original a una forma inactiva, aumentando el peso molecular, reduciendo la reactividad y mejorando la propiedad de transporte. Finalmente, en la Fase III ocurre la conjugación que permite eliminar el complejo químico de la célula al medio extracelular (Gratz 2007). Las enzimas que median estas reacciones tienen amplia especificidad, y por lo tanto son capaces de generar una variedad de productos metabólicos (Yousofshahi et al. 2015). El hígado es el principal órgano en el que tienen lugar las reacciones de fase I y fase II o la

biotransformación de los xenobióticos. Las enzimas del citocromo P450 (CYP) desempeñan un papel especialmente importante en la modificación de la Fase I, que a menudo implica la oxidación del sustrato mediante la introducción de un grupo hidroxilo o un átomo de oxígeno. Dependiendo del sustrato, una reacción de CYP puede producir un derivado altamente reactivo que puede unir y modificar otras moléculas en la célula, incluidas las macromoléculas, y por lo tanto presentar un riesgo de citotoxicidad (Kang et al. 2016; Repetto 1995; Yousofshahi et al. 2015).

6.1. Modelos de estudio de metabolismo y absorción de xenobióticos

Existen diferentes modelos para el estudio del metabolismo de estas sustancias: *in vitro* (modelos de líneas celulares en cultivo), *ex vivo* (tejidos animales), *in vivo*. Estos métodos representan diferentes aproximaciones valederas que han sido utilizadas (Anon 2012; Reddy et al. 2006b; Troxel et al. 1997; Wells & Spence 2014). En la tabla 2 se describen algunos métodos de estudio de los xenobióticos

Tabla 2: Modelos de estudio de los xenobióticos.

Modelos *in vitro*

Modelos que simulan el tracto gastrointestinal (SHIME por sus siglas en inglés) (Wells & Spence 2014):

Línea celular *Caco-2*: representan enterocitos que derivan de tejido de carcinoma de colon humano y se diferencian espontáneamente en modelo de tejido epitelial intestinal. Se usan como modelo de la barrera intestinal, aunque son de origen colónico, expresan proteínas apicales y baso laterales de las funciones específicas de los enterocitos del intestino delgado. Además, las alteraciones estructurales y funcionales inducidas por bacterias patógenas y no patógenas se han investigado usando esta línea celular o clones de *Caco-2* (Bengoa et al. 2017; Humen et al. 2011; Sambuy et al. 2005)

Línea celular p-Heps: hepatocitos primarios humanos que se han utilizado para

identificar toxicidad hepática potencial en humanos. Sin embargo, los p-Heps tienen una capacidad limitada para la proliferación y pierden rápidamente sus funciones hepáticas *in vitro* (Jha et al. 2013; Kang et al. 2016)

Línea celular HepG2: Células de hepatocarcinoma, usadas para los estudios de xenobioticos, y estrés oxidativo. Ha sido una herramienta útil en estos estudios, donde se observan mecanismos ejercidos en el proceso de absorción de las AFB₁ (Liu et al. 2014; Reddy et al. 2006a; Su et al. 2016)

Ventajas

- Son económicos
- Simplifica el sistema de estudio
- Se realiza en tiempos cortos

Desventajas

- No es posible extrapolar a un sistema complejo
- Da información parcial del estudio
- No sustituye el modelo *in vivo*

Modelos *ex vivo*

El término *ex vivo*, hace referencia a procedimientos, mediciones o experimentos en tejidos o células vivas, que han sido extraídas del organismo, y que se mantienen vivas en un medio controlado. Bucles intestinales perfundidos *in situ* y bucles intestinales *ex vivo*, donde el tejido no se elimina del animal, sino que permanece en su lugar. Diferentes compartimentos del intestino se pueden separar por ligaduras para estudios de absorción de sustancias químicas (Davies, 1980; Bertholon et al., 2006).

Las piezas de tejido y los sacos intestinales se han empleado para estudiar el transporte de nutrientes durante un largo tiempo y todavía tienen cierta relevancia hasta la fecha en estudios de absorción de xenobióticos (Gratz et al. 2005; Marino et al. 2016; Roda et al. 2010)

Ventajas

- Suministra información de lo que

Desventajas

- Conlleva tratamientos traumáticos para el animal, el
-

-
- | | |
|------------------------------------|---|
| · sucede en un órgano específico | · cuál debe ser reducido. |
| · No considera el sistema completo | · No reemplaza el modelo <i>in vivo</i> |

Modelos *in vivo*

Los modelos fisiológicos usan animales vivos, dosificados con los xenobióticos de interés. La concentración del químico o sus metabolitos se puede determinar en la circulación sistémica o en el tejido diana (Fetaih et al. 2014; Rastogi et al. 2006). Estos estudios permiten obtener información sobre la biodisponibilidad, la velocidad de absorción y la eliminación, del xenobiótico de interés, o sus metabolitos, inoculados por diferentes vías de administración (Kocić-Tanackov & Dimić 2013; Nahar et al. 2013;Roda et al. 2010)

Ventajas

- Permite obtener información más precisa de lo que ocurre en la célula en el contexto del animal.
- Permite obtener información fisiológica frente a la interacción con el xenobiótico
- Permite estudiar el efecto de la sustancia sobre los diferentes órganos o tejidos en único ensayo.

Desventajas

- Conlleva tratamientos traumáticos para el animal, el cuál debe ser reducido.
- Los organismos vivos exhiben una gran variabilidad, que no puede ser realmente controlada
- Dado que cada animal exhibe un comportamiento distinto es difícil obtener datos normalizados

Dada la larga lista de enfoques experimentales disponibles para estudiar la absorción intestinal y el metabolismo, la elección de la técnica adecuada es crucial. Evidentemente, los experimentos con animales *in vivo* tienen muchas ventajas sobre las técnicas *in vitro*, pero se deben tener en cuenta los aspectos éticos a la hora de elegir. Las reglamentaciones actuales sobre experimentación animal se basan en el principio de las tres R: Reducción, Reemplazo y Refinamiento, que se han convertido en la base para la investigación animal "humana" y ética (Balls

1994; Hovell 2013; Sherwin et al. 2003). Reemplazar los experimentos con animales con otros modelos adecuados y optimizar los estudios en animales con el número de animales y los procedimientos utilizados son los puntos más importantes a considerar. Sin embargo, la experimentación con animales ha jugado un papel fundamental en el campo de la investigación de la toxicología y ha proporcionado un vasto conocimiento sobre los riesgos para la salud que los xenobióticos como las aflatoxinas pueden representar para los animales y los humanos (Gil & Pla 2001; Repetto 1995).

7. El kefir y su capacidad antimicrobiana

El kefir es una bebida carbonatada naturalmente (asociada con el metabolismo de las levaduras), con sabor ácido y consistencia cremosa, es una alternativa para la fermentación de matrices lácteas y además una importante fuente de microorganismos probióticos. Los gránulos de kefir consisten en una matriz de polisacáridos compuestos por una compleja asociación entre bacterias y levaduras, que funciona como un cultivo inicial para la fermentación de la leche, se caracterizan por ser una masa gelatinosa irregular de consistencia elástica, son entre blancos y amarillentos (Apar et al. 2017; Garrote et al. 2001; Prado et al. 2015), ver figura 1.



Figura 1: Gránulos de kefir.

En el proceso de fermentación, algunos de los microorganismos del gránulo son transferidos a la leche, entre estos se encuentran: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Acetobacter*, *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* (Garrote, 1999) los

cuales son responsables de la doble fermentación, ácido láctica y alcohólica, a consecuencia de la cual se obtiene una bebida con características organolépticas definidas (Garrote et al. 2000, 2001; Prado et al. 2015; Sarkar 2008). 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 (Gamba et al. 2015; Londero et al. 2012; Liu et al. 2002; Pramela et al. 2017). 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 (Hamet et al. 2015; Piermaria et al. 2009; Rimada & Abraham 2001).

En investigaciones donde se fermentó leche o suero de quesería con el gránulo de kefir, se encontró que el producto fermentado tenía actividad antimicrobiana frente a diversas bacterias patógenas como *E. coli*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus* y contra parásitos como *Giardia intestinales* (Correa Franco et al. 2013; Golowczyc et al. 2008; Kakisu et al. 2013; Londero 2012). El kefiran demostró disminuir el daño producido por *Bacillus cereus* y sus toxinas en células intestinales en cultivo (Medrano et al. 2008, 2009).

Son escasas las publicaciones referidas a la acción del kefir sobre hongos toxicogénicos. La actividad antifúngica del kefir se ha asociado a la capacidad que tienen los gránulos de producir sustancias antifúngicas en el sustrato de fermentación, además de la presencia de los microorganismos. Algunos estudios han sugerido que las altas concentraciones de ácido láctico y acético son los principales inhibidores del crecimiento de los hongos. En ese sentido, Ismaiel et al. 2011 realizaron un estudio de inhibición sobre una cepa de *Aspergillus flavus* AH3 donde determinan que el peso seco del micelio producido disminuye a medida que aumenta la concentración de sobrenadante de kefir libre de células, y de igual manera disminuye la producción de AFB₁. Caro y León 2014 demostraron la

capacidad inhibitoria del kefir obtenido por la fermentación de “Agua de panela” (bebida autóctona Colombiana) sobre *A. ochraceus*.

También se han realizado estudios donde los sobrenadantes de diferentes sustratos lácteos fermentados con gránulos de kefir CIDCA AGK1 y CIDCA AGK10, demostraron tener capacidad antifúngica contra *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus macrosporus* var. *rhizopodiformis*, *Penicillium crustosum*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium graminearum*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium sumantrens* (Gamba 2015; León Peláez 2013; Londero 2012). Los sobrenadantes tienen efecto principal en la reducción del porcentaje de germinación de los conidios, obteniendo en todos los casos una capacidad alta de inhibición mayor al 70%. Además, se observó modificación de los parámetros de crecimiento de los hongos en medios sólidos, aumento del tiempo de latencia y reducción de la velocidad de crecimiento. La actividad antifúngica de los sobrenadantes de kefir se atribuye a la capacidad de producir ácidos orgánicos con un concomitante descenso del pH. Sin embargo las mismas concentraciones de ácidos láctico y acético agregadas artificialmente presentaron capacidad antifúngica menor, por lo tanto estos autores concluyeron que se producen otro tipo de metabolitos en la fermentación con capacidad antifúngica que potencian este efecto (Gamba et al. 2016; León Peláez et al. 2012, 2013). Sin embargo hasta ahora no se conocen la capacidad antifúngica de las cepas aisladas de kefir y sus metabolitos.

Estudios del grupo de trabajo han demostrado que tanto la Fracción Microbiana del Kefir (FMK) microorganismos aisladas de los gránulos tienen capacidad de captura de AFB₁ (Gamba 2015; León Peláez 2013). La FMK también presentó la capacidad de proteger de la acción de la AFB₁ a las líneas celulares Caco2-TC7 y HepG2. Se observó una disminución en la citotoxicidad cuando las líneas celulares fueron sometidas a concentraciones letales de AFB₁ (300ppb) y se co-cultivaron con la FMK pasteurizada previamente, mostrando actividad biológica cuando los microorganismos no están viables (Gamba et al. 2015).

7.1 Microorganismos aislados de kefir

En el grupo de microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA) se han aislado más de cien cepas bacterianas y de levaduras de diferentes gránulos de kéfir (Delfederico et al. 2005; Diosma et al. 2014; Garrote et al. 2004; Hamet et al. 2015). A muchos de estos microorganismos aislados se les ha estudiado la capacidad antimicrobiana, y actividad biológica. Bolla et al., 2013 demostraron la capacidad de una mezcla de microorganismos aislados de kefir (*Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348, *Lactococcus lactis* CIDCA 8221, *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 y *Saccharomyces cerevisiae* CIDCA 8112) para inhibir el crecimiento de *Shigella sonnei in vitro* y también reducir la citotoxicidad de las toxinas de *Clostridium difficile* en células eucarióticas (Trejo et al. 2013). En otro estudio se encontró que una tricepa de *Saccharomyces lipolytica* 8112, *L. plantarum* CIDCA 83114 y *L. kefir* CIDCA 8348 lograron disminuir la tasa de infección por *Giardia intestinalis* en ratones C57 (Humen 2009).

Hasta hoy uno de los microorganismos más estudiados por el grupo es *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114. Este microorganismo ha demostrado tener una alta resistencia a las condiciones de presión y temperatura en el sacado por spray y manteniendo posteriormente su actividad biológica (Golowczyc et al. 2011; Hugo et al. 2016), además de poseer propiedades antimicrobianas y capacidad de reducir la toxicidad de la toxina Shiga de *Escherichia coli* O157:H7 en células Vero (Kakisu, et al. 2013). Los sobrenadantes del cultivo de *L. plantarum* CIDCA 83114 presentó capacidad para disminuir la invasión de *Salmonella* en células Caco-2/TC-7 (Golowczyc et al. 2008). *L. plantarum* CIDCA 8316, CIDCA 8329, CIDCA 8346 aislados de gránulos de kefir, presentaron capacidad de estimulación del sistema inmune y porcentajes de adhesión cercanos al 10% (Golowczyc 2008).

Con respecto a la actividad antifúngica *L. plantarum* CIDCA 83114, CIDCA 8316, CIDCA 8329 presentaron una capacidad antifúngica fuerte frente a *A. parasiticus* NRRL 2999, *P. sumatrense* CMUNLP3, *A. flavus* AFUNL5 AFB₁ (León Peláez 2013).

Los microorganismos descritos representan un desafío para la industria alimenticia para ser utilizados para la prevención o tratamiento de contaminación

frente a los hongos filamentosos. Los estudios mencionados en los párrafos anteriores que utilizaron cepas de *L. plantarum* aisladas de kefir y de otras fuentes permiten deducir que estos microorganismos pueden aportar metabolitos con capacidad antifúngica, y pueden ser usados en modelos de protección.

8. Permeado de suero (PS)

El permeado de suero es un sustrato que ha sido previamente usado por el grupo de trabajo, se ha encontrado que algunos microorganismos lo usan como fuente de azúcares y logran fermentarlo y crecer. Los gránulos de kefir también tienen la capacidad de transformarlo. A continuación se hará una descripción del producto (Gamba et al. 2015, 2016; León Peláez 2013; Song et al. 2007)

8.1 Permeado de suero como sustrato de la fermentación

El permeado de suero, proveniente del lactosuero, es un subproducto de la industria láctea. Según el CODEX el suero es el producto lácteo líquido obtenido durante la elaboración del queso, la caseína o productos similares, mediante la separación de la cuajada, después de la coagulación de la leche y/o los productos derivados de la leche (Codex Alimentarius, 1995). Se estima que unas 450 mil toneladas de suero líquido se generan anualmente (Speranza, 2011). El componente principal del mismo, después del agua, es la lactosa, que puede utilizarse como sustrato para su fermentación. Las características que posee lo transforman en un insumo de alto valor industrial por sus múltiples aplicaciones (Prazeres et al. 2012). 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. El lactosuero constituye el 90% de la leche y contiene proteínas solubles, lactosa, vitaminas (A, B1, B2, D) y sales minerales. El suero es un subproducto que representa una de las mayores reservas de proteínas alimentarias, el cual en la década de los 90 estaba por fuera de los canales de consumo humano (1997). Si bien en los últimos años se encontraron aplicaciones para este subproducto (Prazeres et al. 2012), aun hoy representa una fuente útil para su uso en nuevos desarrollos de productos. La mala gestión del suero trae asociado un alto impacto medioambiental. Por este motivo,

cada vez más se intenta buscar su mejor aprovechamiento. En la figura 3 se observa el proceso mediante el cual se obtienen los productos y subproductos en la elaboración del queso.

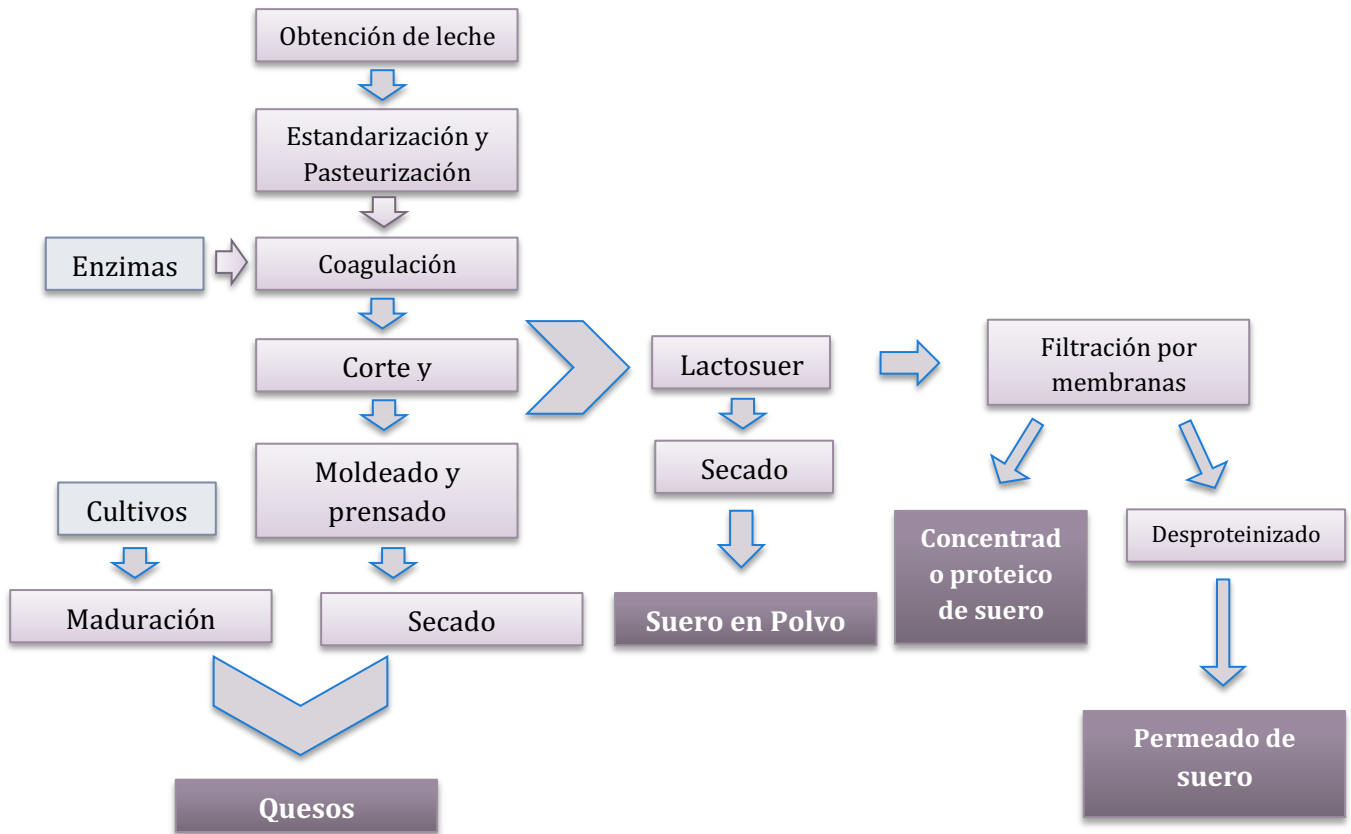


Figura 2: Procesamiento de la obtención de productos y subproductos en la elaboración de quesos. Esquema adaptado de Gunasekaran y Ak (2003) y Valencia (2008).

Anteriormente el permeado de suero era destinado principalmente a la alimentación animal como nutriente energético para el engorde de cerdos y otras especies (Spalatelu 2012). 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 PS está siendo reciclado por otras vías, con un mayor valor agregado (González Siso 1996; Prazeres et al. 2012). 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. 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).

9. Justificación del estudio

En este estudio se investigó la posibilidad de la administración de un probiótico económico a pollos parrilleros con el objeto de disminuir la concentración de antibióticos en la dieta. Para desarrollar el un producto final económico, se usaron los microorganismos del kefir (producto natural y artesanal) y el PS, que es un efluente de la industria láctea. Teniendo en cuenta algunos de los problemas de contaminación de la industria avícola como los hongos que afectan tanto la salud de las aves, los operarios y los consumidores, se planteó la necesidad de utilizar cepas que tuvieran la capacidad de inhibir a los hongos presentes en los criaderos y secuestrar sus micotoxinas.

Para el desarrollo del trabajo es importante entender que el bajo costo de la producción de este sustrato implicaría una solución para pequeños productores avícolas. Los hongos filamentosos implican para la industria un problema de productividad. Tanto el kefir entero como los microorganismos aislados del kefir se podrían utilizar para el desarrollo de un nuevo producto con capacidad antifúngica y descontaminante de micotoxinas, que además poseería actividad probiótica. Se estudiaron entonces las características del producto fermentado, la capacidad antifúngica, la capacidad de capturar micotoxinas y proteger la línea celular HepG2 de la actividad de las aflatoxinas. Finalmente, se administró el probiótico en diferentes condiciones a pollos parrilleros para comprobar si las cepas y el kefir eran inocuas.

Materiales y Métodos

1. Gránulos de kéfir y microorganismos aislados de kefir empleados.

Condiciones de crecimiento

Se realizó una selección de microorganismos aislados de los gránulos de kefir y el gránulo de kefir, basados en estudios previos de nuestro grupo de trabajo. Se tuvieron en cuenta las características estudiadas previamente como su capacidad de producir sustancias antimicrobianas, reducir el crecimiento fúngico y tener capacidad de captura de micotoxinas.

Tabla 1: Microorganismos seleccionados y origen

Cepa	Origen	Fuente
<i>L. plantarum</i> CIDCA 83114	Gránulo CIDCA AGK1	
<i>L. plantarum</i> CIDCA 8316	Gránulo CIDCA AGK1	
<i>L. plantarum</i> CIDCA 8329	Gránulo CIDCA AGK2	(Garrote 1999)
<i>L. plantarum</i> CIDCA 8346	Gránulo CIDCA AGK4	
Gránulos AGK1	Cepario CIDCA	

CIDCA Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos.

En la tabla 1 se muestran de donde provienen las cepas de *Lactobacillus plantarum* y el origen los gránulos con los que se desarrolló el trabajo. Las cepas de *L. plantarum* se activaron en medio de cultivo caldo Man Rogosa & Sharpe (MRS) Difco (Detroit, USA) al 1 % y se incubaron a 30 °C durante 24 horas, posteriormente se hizo un segundo pasaje en cultivo fresco al 1 % en MRS y se incubaron en las mismas condiciones descriptas. Una vez pasado este proceso de activación inicial se utilizaron en los diferentes experimentos.

Los gránulos de kefir CIDCA AGK1, se activaron cultivándolos en leche (UHT) descremada durante 24 horas a 20 °C.

1.2 Obtención permeado de suero fermentado con *Lactobacillus plantarum*

Se empleó permeado de suero deshidratado (PS) en polvo suministrado por Arla Foods Ingredients S.A. El PS se reconstituyó en agua destilada al 5 % y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Las cepas de *L. plantarum*, fueron reactivadas en MRS tal como se describe anteriormente, se inocularon al 2 % v/v, en permeado de suero (PS) reconstituido y se incubaron durante 48 horas a 30 °C.

Para determinar la concentración de microorganismos viables (UFC/ml) en el producto fermentado con las cepas de *L. plantarum* se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

- Agua triptona Biokar Diagnostics (Beauvais, France), para las diluciones seriadas.
- Medio de cultivo De Man Rogosa & Sharpe (MRS) agar por Difco (Detroit, USA). Para recuento de bacterias lácticas.

Todos los medios de cultivo, se esterilizaron en autoclave a 120 °C, durante 15 min. (Ver anexo 1).

Del permeado de suero fermentado con *L. plantarum* (PSFLp) se llevaron a cabo diluciones seriadas en triptona 0,1 % y se realizó un recuento de microorganismos viables en placa empleándose MRS agar. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonia por ml (UFC)/ml.

1.3 Obtención permeado de suero fermentado con granulo AGK1

Para la fermentación de gránulos de kéfir AGK1 se utilizó permeado de suero comercial en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. Los gránulos de kefir CIDCA AGK1 se cultivaron al 10 % p/v en PS y se incubaron a 30 °C durante 24 horas. Después de la fermentación los gránulos se separaron del producto fermentado por filtración con un colador de plástico, se lavaron con agua destilada y fueron puestos en leche (UHT) descremada La Serenisima® para su conservación. (Gamba et al. 2015b)

Del permeado de suero fermentado con kefir (PSFK) se llevaron a cabo diluciones seriadas en triptona 0,1 % y se realizó un recuento de microorganismos viables en placa empleándose MRS agar para bacterias ácido lácticas (BAL), YGC agar para levaduras y BAA agar (Formulado) para bacterias ácido acéticas (BAA.

Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC)/ml.

- Yeast Extract-glucose chloramphenicol (YGC) agar Biokar Diagnostics (Beauvais, France) para recuento de levaduras
- Agua triptona Biokar Diagnostics (Beauvais, France), para las diluciones seriadas.
- Medio de cultivo De Man Rogosa & Sharpe (MRS) agar por Difco (Detroit, USA). Para recuento de bacterias lácticas.
- Medio formulado para bacterias ácido Lácticas (BAA) formulado (ver anexo1)

1.4 Medida del cambio de biomasa de los gránulos de kefir y de pH en el producto fermentado

Los gránulos fueron incubados en leche o suero durante 10 días con cambio de sustrato cada 24 hs. Al final de cada periodo de incubación los gránulos se lavaron con agua destilada, se secaron con papel absorbente hasta peso continuo y se pesaron en una balanza granataria (Ohaus® Ohio, Estados Unidos) el esquema esta descrito en la figura 1.

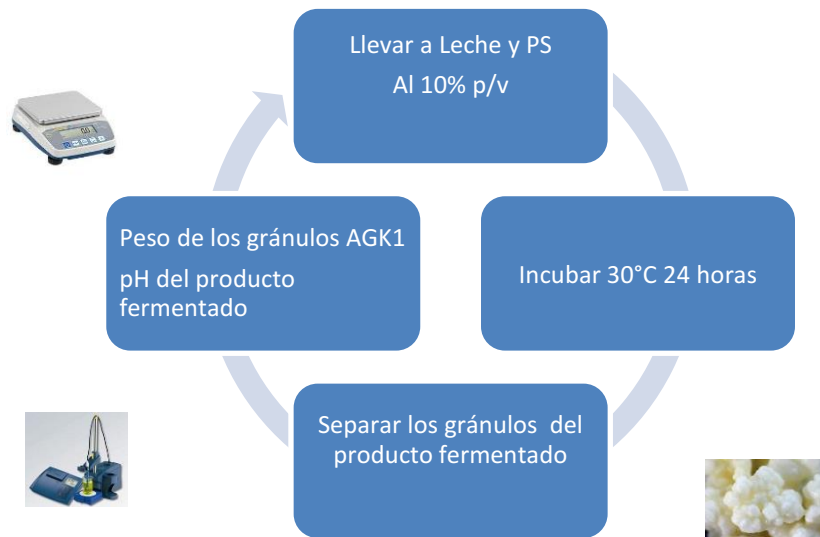


Figura 1: Esquema de medida de peso de los gránulos en PS y leche, y medida de pH en la leche fermentada con gránulos (LFK) y permeado de suero fermentado con gránulos (PSFK). Medidas realizadas durante 12 días.

El incremento de biomasa se calculó como:

$$\Delta P = \frac{P_0 - P_f}{P_0} \quad \text{Ecuación 1}$$

Dónde:

P_0 = Peso de los gránulos antes de inocular

P_f = Peso de los gránulos al finalizar el ciclo de fermentación de 24horas

Al producto fermentado después de cada periodo de incubación se le determino el pH final, se utilizó un peachímetro con un electrodo combinado de vidrio calomel (EZDO-PC, Altronix, Argentina) y se calculó el delta de descenso de pH como:

$$\Delta pH = \frac{pH_0 - pH_f}{pH_0} \quad \text{Ecuación 2}$$

Dónde:

pH_0 = ph de la leche o el PS sin fermentar.

pH_f = pH del producto fermentado al finalizar el ciclo de fermentación de 24horas

1.5 Cinéticas de pH del permeado de suero fermentados con cepas de *Lactobacillus plantarum* y gránulos CIDCA AGK1

Después de agregar los gránulos de kefir CIDCA AGK1 o las cepas de *L. plantarum* en PS, se realizaron cinéticas de pH. Para esto se tomaron medidas de pH desde la hora 0 hasta las 48 h de incubación cada de dos horas. Se utilizó un peachímetro con electrodo combinado de vidrio calomel (EZDO-PC, Altronix, Argentina) previamente calibrado. Los resultados fueron expresados como pH en función del tiempo.

1.6 Determinación y cuantificación de ácidos orgánicos en el permeado de suero fermentado con *Lactobacillus plantarum* y con gránulos AGK1

Se realizaron estas determinaciones a partir del PS fermentado con las cepas de *L. plantarum* o el granulo de kefir CIDCA AGK1 descrito anteriormente. Los PS fermentados se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga Eppendorf 5415D (Eppendorf®, Alemania), se descartó el pellet y el sobrenadante fue filtrado en filtros de celulosa de 25 mm (Millipore). La concentración de ácidos orgánicos se determinó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) según el método descrito por Lombardi et al. (1994). La separación de los ácidos se llevó a cabo en una columna de intercambio iónico AMINEX HPX- 87H (BioradLabs) equipado con un detector UV a 214 nm (Waters TM 996, Millipore Corporation, Milford, MA 01757, USA). La identificación se basó en la comparación de los tiempos de retención de los ácidos de las muestras con soluciones estándar de ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Los sobrenadantes se filtraron a través de una membrana de 0,45 µm (Millipore Corporation) y se inyectó en el cromatógrafo un volumen de 10 µl. La determinación se llevó a cabo a una velocidad de flujo de 0,7 ml / minuto a 60 °C utilizando H₂SO₄ 0,009 N como fase móvil.

Se realizaron curvas de calibración con ácido láctico (500, 1000, 4000, 8000, 10000, 14000 ppm), ácido acético (25, 50, 100, 200, 700, 1500 ppm) ácido propiónico (20, 50, 150, 200, 500 ppm) y ácido butírico (20, 50, 100, 150, 200, 500 ppm)

1.6.1 Cálculo de la concentración de ácidos orgánicos no disociados en el permeado de suero fermentado con *Lactobacillus plantarum* y gránulos AGK1

Ya que se ha demostrado que la acción inhibitoria y antimicrobiana del kefir y sus cepas aisladas es proporcional a la concentración de ácidos orgánicos no disociados (Gamba et al. 2015b; Garrote et al. 2000; León Peláez et al. 2006), se determinó la concentración de los ácidos no disociados con la siguiente ecuación:

$$HA = \frac{([Ca] \times [H^+])}{([H^+] + K_a)} \quad \text{Ecuación 3}$$

[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,pK_a. propiónico:4,88pK_a. butírico: 4,82).

2. Hongos empleados

Los hongos empleados en este estudio se aislaron dentro de un proyecto en común (PICT 2011-0716) UNLP- INTA, por personal científico del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA EEA), Laboratorio de Sanidad Aviar- Concepción del Uruguay, en la zona de producción aviar. En el INTA EEA se aislaron un total de 38 hongos: 2 hongos obtenidos en el aire de las nacedoras, 4 de alimento para pollo, 23 de agua de bebedero, 2 de cama y 7 de pulmón de pollo. A partir de esta información se decidió trabajar con 6 hongos. Los criterios de selección se determinaron de manera cualitativa, teniendo en cuenta los tiempos de crianza y ambientes en contacto con las aves.

Tabla 2. Hongos seleccionados de la colección del INTA EEA

No ^a	Nombre ^b	Origen ^b
I-3	G0074(3)	Aire sala nacedoras
I-4	G0074(24)	Aire nacedoras
I-5	3-1(2)INV0205	Alimento
I-6	3A- 2(4)INV0205	Alimento
I-12	HCU 21/14	Agua
I-37	HCU 46/14	Cama

^a Numeración dada por el cepario cátedra de Microbiología UNLP, según el número de hongo que entra al cepario. ^b Información suministrada por INTA EEA Laboratorio de Sanidad Aviar. (Dr Dante Bueno, comunicación personal)

2.1 Condiciones de crecimiento de los hongos

Los hongos se conservaron a 5°C en agar-agua (ver anexo 1) y se reactivaron inoculando una ansada del agar-agua conteniendo los conidios, en tubos con agar inclinado Papa Dextrosa (PDA, Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Luego, fueron incubados a 30°C durante 5-7 días hasta esporulación. Pasado este tiempo se realizó un repique de cada hongo a PDA en caja de Petri o tubos con agar inclinado según se necesitara.

2.3 Identificación molecular de los hongos por método de secuenciación

Los métodos moleculares permiten una identificación rápida y fiable de los organismos a nivel de especie (Vero 2016). La identificación molecular de los hongos estudiados, permitió caracterizar *Aspergillus* a nivel de especie. A continuación se describe los pasos que se siguieron para la identificación molecular de los hongos.

2.3.1 Ruptura celular y obtención del ADN purificado

Cada hongo se incubó por 72 horas sin agitación en caldo YES formulado (ver anexo) a 30 °C este caldo se utiliza con el objeto de obtener mayor proporción de micelio y menor cantidad posible de conidios, debido a que su alta concentración de sacarosa retarda la esporulación). Pasado el tiempo de incubación se extrajo el micelio del caldo de cultivo con pinzas estériles y se secó

en papel secante estéril. Una porción aproximadamente de 150 mg se depositó en un tubo plástico de 1,5ml, se cubrió con nitrógeno líquido y se pulverizó hasta polvo fino por presión mecánica con varilla de vidrio (Vero 2011). A partir del micelio pulverizado se siguió con los pasos del protocolo del Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega® (Wisconsin, EEUU) siguiendo la metodología descrita para tejidos vegetales. El ADN obtenido fue almacenado hasta su uso a -20 °C en eppendorf libres de ADN.

2.3.2 Amplificación del ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la identificación de hongos filamentos tanto en la industria alimentaria como en la clínica se utilizan frecuentemente la amplificación región ITS1 – 5.8SrDNA –ITS2, siendo esta además útil en la identificación de los hongos del genero *Aspergillus* (Henry et al. 2000). Para la obtención de la región ITS1 – 5.8SrDNA –ITS2 se utilizaron los cebadores ITS1 e ITS4 cuyas secuencias se encuentran en la tabla 3:

Tabla 3: Secuencias de los cebadores

Cebador	Secuencia	Fuente
ITS1	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3'	Henry et al. 2000
ITS4	5' TCCTCCCGCTTATTGATATGC – 3'	Luo & Mitchell 2002

Para la amplificación se procedió a preparar una mezcla inicial de reacción o *premezcla* que consta de los reactivos básicos necesarios para la amplificación. En la Tabla 3 se presentan, a modo de ejemplo, los reactivos necesarios para realizar la amplificación de una muestra con un volumen final de 25 µl. Los volúmenes varían según el número de muestras y el volumen final deseado. Tanto para la preparación del material como para la manipulación se utilizaron guantes con el objetivo de proteger a la muestra de enzimas que degradan el ADN o de la contaminación con material extraño.

Tabla 4: *Premezcla* para la reacción de PCR.

Reactivos	Volumen (μ l)
Buffer taq ^a 10x	2,0 (1 X)
MgCl ₂ ^a (50 mM)	0,6 (3 mM)
dNTP's ^a (2 mM)	2,0 (0.2 mM)
ITS 1 ^b (100 mM)	2 μ l (10 mM)
ITS 4 ^b (100 mM)	2 μ l (10 mM)
Taq polimerasa ^a	0,2(1 U)
Agua miliQ	c.s. 25 μ l

Premezcla realizada según indicaciones del proveedor ^a Proveedor (Productos Bio-Lógicos, Quilmes, Argentina) ^b proveedor (Invitrogen, USA)

2.3.3 Ciclo para la Reacción en Cadena la Polimerasa (PCR)

La reacción de amplificación se llevó a cabo en una termocicladora Agilent technologies® Stratagene Gradient Cycler. En la figura 2 se puede ver el programa usado para la amplificación de la región mencionada (Magnani et al. 2005).

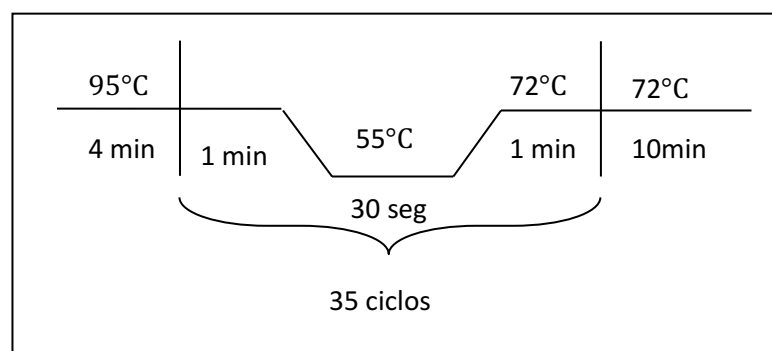


Figura 2: Ciclo de PRC para los cebadores ITS1 – ITS4

Consecutivamente se realizó un gel de agarosa al 1,2 % p/v con bromuro de etidio, donde se sembraron las muestras para determinar la presencia los amplicones, adicionalmente se sembró un patrón de peso molecular de 1000 pb, el tamaño del fragmento esperado es entre 300 a 900 pb. El gel obtenido se observó en un transiluminador (Labnet®, DyNA Light Dual intensity UV, Estados Unidos).

2.3.4 Secuenciación

Los amplicones obtenidos por PCR de los hongos seleccionados fueron enviados para su secuenciación a Macrogen (Seul, Korea) y las secuencias obtenidas fueron analizadas por comparación con la base de datos del GenBank. Se utilizó el software BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) y se determinó la similitud de estas secuencias parciales con las secuencias conocidas de cepas tipo. Su comparación con las secuencias disponibles en las bases de datos públicas permite asignar las cepas a una especie cuando el porcentaje de homología de sus secuencias es superior o igual a 99% (Kurtzman 2014).

2.4 Capacidad antifúngica de las cepas de *Lactobacillus plantarum* seleccionados y del granulo CIDCA AGK1 sobre los hongos seleccionados e identificados

Para estudiar la capacidad antifúngica de las cepas de *L. plantarum* y los gránulos de kefir AGK1, se realizaron tres tipos de ensayos, inhibición fúngica por sobrecapa, inhibición de la germinación, reducción de la tasa de crecimiento y aumento de la fase de latencia (Caro Velez & León Peláez 2015; Gamba et al. 2016b; León Peláez et al. 2012).

2.4.1 Inhibición fúngica por sobrecapa

Los *L. plantarum* se cultivaron en MRS agar pico de flauta durante 24 horas a 30°C, a partir de este cultivo se inoculan en líneas de 2 centímetros sobre agar MRS en placa de Petri y se dejaron crecer durante 24 horas a 30°C o hasta crecimiento en línea visible. Terminado el tiempo de incubación se agregaron 10ml de agar Malta blando conteniendo 1×10^4 conidios/ml, fundido a 40°C. Se dejó solidificar y se incubó durante 48-72 a 30°C. Finalizado éste período se midió la zona de inhibición de crecimiento fúngico alrededor de la línea de crecimiento bacteriano.

Las zonas claras de inhibición se clasificaron de la siguiente manera: (-) No hay inhibición, (d): sólo inhibición sobre la línea, (+) zona de inhibición menor a 5mm, (++) zona de inhibición mayor a 5mm (Onilude et al. 2005).

Esta prueba se realizó solo con las cepas de *L. plantarum* y los seis hongos seleccionados descritos en el inciso anterior (1.6).

2.4.2 Reducción de la germinación de los conidios (%RG)

Se estudió la capacidad de los sobrenadantes libres de células (SLC), de PSFK y el PSFLp, de reducir la germinación de los conidios. Se utilizó la técnica de reducción de la germinación de los conidios en placas estériles de microdilución de 96 fosas (Brand®, Wertheim, Alemania) (Gerez et al. 2009; Lavermicocca et al. 2000).

Se agregaron 10 µl de una suspensión con 10⁴ conidios/ml de cada hongo a fosas con 190 µl del SLC del producto fermentado a evaluar. 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. El control negativo consistió en SLC proveniente de los productos fermentados que no fue adicionado con la solución de conidios.

Una vez inoculado cada tratamiento, se incubaron las placas a 30°C por 48 h. Se midió la DO de los tratamientos a una longitud de onda de 580 nm en lector de placas (ELISA Plate Reader SLT Rainbow Reader, Wien, Austria).

La actividad antifúngica de los SLC fue expresada como el porcentaje de reducción de la germinación (%RG) medido a una DO₅₈₀ comparado con el control, mediante la fórmula:

$$\%RG = \left(\frac{DO_C - DO_T}{DO_{CP}} \right) \times 100 \text{ Ecuación 4}$$

Donde:

DO_C = Densidad óptica del control positivo

DO_T = Densidad óptica del tratamiento

Una reducción de la germinación de los conidios mayor al 20 % se consideró positiva, entre 20 y 40% baja, entre el 40 % y 70 % media, y fuerte por encima del 70 % (Gamba et al. 2015b). Los ensayos fueron realizados por cuadruplicado, y se hicieron tres repeticiones de cada experimento.

2.4.3 Determinación del efecto del permeado fermentado (*L. plantarum* o CIDCA AGK1) sobre las características de crecimiento de los hongos

Dada la forma circular de crecimiento de los hongos filamentosos en medios sólidos, se tomaron medidas del crecimiento de las colonias diariamente como medida de las características cinéticas de los hongos.

A partir del medio agar Malta (ver anexo 1) se reemplazó el 70 % del agua de reconstitución con el permeado fermentado por las cepas de *L. plantarum* o por el gránulo CIDCA AGK1.

El pH final del medio se determinó con un peachímetro con un electrodo combinado de vidrio calomel (EZDO-PC, Altronix, Argentina) previamente calibrado. La mezcla medio-sustancia antifúngica se sirvió en placas de Petri (85 mm de diámetro) y se dejó solidificar. Para esto, se agregaron 10 µl de una suspensión con 10⁴ conidios/ml en el punto central de la placa de Petri con Agar Malta formulado (ver anexo 1) y se midió el punto de siembra inicial con un calibre. Durante toda la fase de crecimiento se midió cada 24 horas el diámetro de los hongos hasta alcanzar el total de la placa de Petri (diámetro total de 85mm). La prueba se realizó con dos controles medio agar malta formulado completo (Ver anexo 1) y agar malta – PS estéril y filtrado al 70 %. A partir de las mediciones realizadas se obtuvieron las curvas de crecimiento con relación al tiempo, la tasa de crecimiento K_D (mm/h), el tiempo de duración de la fase de latencia Lag (h). La tasa de crecimiento fúngico K_D se calculó como la pendiente de la regresión lineal obtenida del gráfico del diámetro del hongo (mm) en relación al tiempo (h) en la fase lineal de crecimiento, mediante el programa GraphPadPrims. La fase de latencia Lag (h) corresponde al tiempo en el cual el hongo supera el diámetro inicial de inóculo.

$$Lag(h) = \frac{D_0 - Y_0}{K_D} \text{ Ecuación 5}$$

Donde

D_0 : diámetro inicial

Y_0 = Punto de corte de la recta de la regresión lineal en el eje Y

K_D = Pendiente de la recta en la regresión lineal de crecimiento fúngico

(León Peláez et al. 2012; Molina & Giannuzzi 1999)

Una vez determinadas las características cinéticas de los hongos en los diferentes medios se calculó la capacidad de reducción de la tasa de crecimiento y el aumento de la fase de latencia en presencia en presencia de SLC.

Con la fase Lag (h) de los diversos tratamientos y su respectiva K_D (mm/h) se calcularon los índices de Incremento de la fase Lag (IILag %) y de Inhibición de K_D (IIK_D%)

$$IIK_D \% = \left[\frac{(K_{Dcontrol} - K_{Dtratamiento})}{K_{Dcontrol}} \right] \times 100 \text{ Ecuación 6}$$

Donde:

$K_{Dcontrol}$ = Tasa de crecimiento del control

$K_{Dtratamiento}$ = tasa de crecimiento de cada tratamiento

$$IILag \% = \left[\frac{(Lag_{tratamiento} - Lag_{control})}{Lag_{control}} \right] \times 100 \text{ Ecuación 7}$$

Donde:

$Lag_{tratamiento}$ = Tiempo de la fase Lag de cada tratamiento

$Lag_{control}$ = Tiempo de la fase Lag del control

2.5 Capacidad de captura de AFB₁ de la fracción microbiana del granulo CIDCA AGK1 (FMK) y de *Lactobacillus plantarum* seleccionados

Para obtener la FMK los gránulos CIDCA AGK1 se inocularon en PS durante 24 horas a 30°C, y se separaron los gránulos del producto fermentado filtrándolos con un colador de plástico. El PS fermentado se centrifugó a 2900 rpm durante 10 minutos en una centrifuga Rolco® (Argentina), posteriormente el pellet obtenido se lavó tres veces con PBS y una vez con agua MiliQ. La solución final obtenida con la FMK se llevó a una concentración de DO₆₀₀ 10.

Para la obtención de *L. plantarum*, se cultivaron en 10 ml de MRS caldo durante 16 horas, a partir de este cultivo se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente y llevado a la una DO=10.

Los desafíos se hicieron co-incubando los microorganismos resuspendidos en 2 ml de solución (DO=10) de 300 ppb de aflatoxina B1 (AFB₁) a 30 °C durante 30 minutos en un agitador orbital (Peltonen et al. 2001). Una vez terminado el desafío, se centrifugaron todas las soluciones por 15 minutos a 13000 rpm en ultracentrífuga Eppendorf 5415D (Eppendorf®, Alemania), separando el sobrenadante (SN) del pellet.

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. Una vez que se obtuvieron los SN sin presencia de microorganismos, se transfirieron 200µl a un vial de 4 ml de capacidad con tapa de teflón; posteriormente se adicionaron 700µl de reactivo de derivatización (acidotrifluoroacético / ácido acético / agua; 2:1:7). El contenido se calentó a 65 °C (derivatización) durante 10 minutos en baño termostático y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente la determinación de aflatoxina B₁ se realizó 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.

2.6 Estudio de la capacidad de protección de la FMK y de *Lactobacillus plantarum* seleccionados frente al modelo celular HepG2

2.6.1 Cultivo celular HepG2

Las células HepG2 son una línea celular proveniente de cáncer de hígado, derivadas del tejido hepático de un adolescente de 15 años caucásico que presento

un hepatocarcinoma bien diferenciado. Las células fueron provistas por el cepario del CIDCA, en placas de 48 wells en una concentración inicial de 2.5×10^5 células/ml, se cultivaron en Eagle's Minimum Essential Medium (DMEM Gibco BRL Life Technologies, Rockville, MD, USA) suplementado con suero fetal bovino (FBS por sus siglas en inglés) al 10%. Las células fueron cultivadas en atmósfera humidificada al 95 % y 5 % de CO_2 (Patnaik & Padhy 2016). Después de 48 horas de incubación las células fueron expuestas a los diferentes tratamientos.

2.6.2 Determinación del daño de las células HepG2 frente a la exposición a aflatoxina B₁

Una vez pasadas las 48 horas necesarias de incubación de las células, fueron lavadas tres veces con PBS, y luego se adicionaron concentraciones progresivas de AFB₁ disueltas en DMEM (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ppm). Posteriormente fueron llevadas a incubación en las condiciones descritas anteriormente, durante 24 horas. Para determinar el daño celular se analizaron las enzimas citoplasmáticas lactato deshidrogenasa (LDH) y aspartato aminotransferasa (AST) que aumentan a medida que aumenta el daño. Las medidas se realizaron en el medio de cultivo pasadas las 48 horas en un analizador clínico Wiener Lab CM250 (Polonia).

2.6.3 Determinación de la capacidad de protección de FMK y *Lactobacillus plantarum* seleccionados frente al daño por AFB₁ en el modelo celular HepG2

Dado que los microorganismos tienen la capacidad para acidificar el medio DMEM, los ensayos se realizaron en presencia de los microorganismos tratados previamente con calor, ya que estudios previos han mostrado que la protección y captura de estos no cambia, ya que las propiedades de captura y protección frente a la AFB₁ están asociadas a la pared (Gamba 2015).

Una vez obtenidos los microorganismos, tal como se describe en el inciso 2.5, se llevaron a baño termostático a 65°C durante 35 minutos y se realizaron pruebas de viabilidad en medio MRS. Una vez finalizado el proceso térmico, se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron en DMEM según el tratamiento de la fosa, y luego fue adicionado a las células HepG2 (tabla 5).

Tabla 5: Placa de 48 fosas, ejemplo de distribución de los ensayos

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	control	control	control	control	250ppm+ Lp83114	250ppm+ Lp83114	250ppm+ Lp83114	250ppm+ Lp83114
B	250ppm*	250ppm	250ppm	250ppm	250ppm+ Lp8316	250ppm+ Lp8316	250ppm+ Lp8316	250ppm+ Lp8316
C	450ppm	450ppm	450ppm	450ppm	450ppm+ Lp83114	450ppm+ Lp83114	450ppm+ Lp83114	450ppm+ Lp83114
D	800ppm	800ppm	800ppm	800ppm	450ppm+ Lp8316	450ppm+ Lp8316	450ppm+ Lp8316	450ppm+ Lp8316
E	Lp83114	Lp83114	Lp83114	Lp83114	800ppm+ Lp83114	800ppm+ Lp83114	800ppm+ Lp83114	800ppm+ Lp83114
F	Lp8316	Lp8316	Lp8316	Lp8316	800ppm+ Lp8316	800ppm+ Lp8316	800ppm+ Lp8316	800ppm+ Lp8316

*las concentraciones mostradas son concentración final de AFB₁ en DMEM

Posteriormente fueron llevadas a incubación en las condiciones descriptas anteriormente, durante 24 horas. Para determinar el daño celular se analizaron dos enzimas citoplasmáticas lactato deshidrogenasa (LDH) y aspartato amoninotransferasa (AST) que aumentan a medida que aumenta el daño. Las medidas analizador clínico Wiener Lab CM250 (Polonia).

3. Administración de los microorganismos a pollos parrilleros

3.1 Resistencia de los microorganismos

3.1.1 Resistencia a las condiciones gastrointestinales de las cepas *Lactobacillus plantarum* y la FMK

Para la evaluación de la resistencia a las condiciones gastrointestinales, se utilizó el protocolo descrito por Grimoud et al. (2010) con algunas modificaciones. A los cultivos de *L. plantarum* en fase estacionaria y la FMK de 24 horas de fermentación, se le realizaron dos lavados con PBS y se prepararon 10 mL de suspensión de 10⁸ UFC/mL (aproximadamente DO₆₀₀ 0,2). Posteriormente estas soluciones fueron centrifugadas y resuspendidas en 10 mL de solución gástrica

simulada (tabla 6) y se incubaron a 41 °C con agitación a 200 rpm durante 2 horas. Se realizaron dos lavados con PBS, se separó 1 ml para realizar recuentos de microorganismos viables y se resuspendieron en 9 ml de solución intestinal simulada (tabla 6). Se incubó a 41 °C, durante 4 horas, con agitación a 200 rpm. Luego, se realizaron dos lavados con PBS, y se realizó el recuento de microorganismos viables por recuento en placa.

Tabla 6: Soluciones utilizadas para simular las condiciones gastrointestinales

Soluciones	Reactivos (volumen final 1000 ml)	Concentraciones
Gástrica pH 2.5	7,25 g NaCl	NaCl 125 mM
	0,52 g KCl	KCl 7 mM
	3,8 g NaHCO ₃	NaHCO ₃ 45 mM
	3,0 g pepsina porcina (Sigma-Aldrich)	Pepsina 0,3% p/v
Intestinal pH 8	1,3 g NaCl	NaCl 22 mM
	0,25 g KCl	KCl 3,2 mM
	0,65 g NaHCO ₃	NaHCO ₃ 7,6 mM
	1,0 g pancreatina porcina (Sigma-Aldrich)	Pancreatina 0,1% p/v
	1,5 g sales biliares (Sigma-Aldrich)	Sales biliares 0,15% p/v

3.1.2 Resistencia bacteriana al agua con diferentes concentraciones de cloro

Teniendo en cuenta las variaciones del cloro en el agua corriente que se administra a los pollos se realizaron estudios de resistencia a la cloración por parte de las bacterias.

Para la evaluación a la resistencia al agua en diferentes concentraciones de cloro se obtuvieron los cultivos de cada una de las cepas de *L. plantarum* tal y como esta descrito en el inciso 2.5. En el último lavado cada una de las cepa de *L. plantarum* se resuspendió 1/10 en agua estéril a diferentes concentraciones de Cloro 0, 1, 2, 3, 4, ppm. Las soluciones cloradas con los microorganismos se dejaron mantuvieron a temperatura ambientes durante 8 horas y posteriormente se realizaron recuentos de microorganismos viables en placa, los recuento se realizaron en MRS.

Se realizó el mismo procedimiento a partir de la obtención de la FMK obtenida tal como se describe en el inciso 2.5.

3.2 Ensayos *In vivo*

Se realizaron dos experimentos *in vivo* en pollos parrilleros, con el objetivo de evaluar el estado final, desarrollo y parámetros productivos. Se hicieron dos experimentos independientes, en estos se evaluaron dos sustratos diferentes suministrados a los pollos en el agua de bebida, los sustratos están descritos a continuación:

1) Administración en el agua de bebida 1:10 v:v de Permeado de suero fermentado con *L. plantarum* CIDCA 83114. Este sustrato se encuentra descrito en los experimentos como PSF114. El PSF114 que se les suministró a los pollos se obtuvo como se describe en el punto 1.1 de materiales y métodos. El recambio del agua suplementada con PSF114 se realizó cada 8 horas. Los grupos experimentales se pueden ver en la tabla 7.

Tabla 7: Grupos de los tratamientos suministrados a los pollos parrilleros

Agua (Control)	(PS)	PSF114
Pollos que consumen agua corriente	Pollos que consumen permeado de suero (preparado al 5 % p/v y esterilizado) fermentar y en concentración 1 % v/v en agua corriente.	Pollos que consumen permeado de suero (preparado al 5 % p/v y sin esterilizado) fermentado con <i>L. plantarum</i> CIDCA 83114, en concentración 1 % v/v en agua corriente

2) Suministro de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, 8316, 8329, 8346 y la Fracción Microbiana de Kefir del granulo CIDCA AGK1, contenidos en un pellet. La obtención de los pellets se encuentra descrita en el inciso 2.5. Este sustrato suministrado a los pollos en el agua de bebida se encuentra descrito en los experimentos como FMKLP. El recambio del agua suplementada con FMKLP se realizó cada 8 horas. Los grupos experimentales se pueden ver en la tabla 8.

Tabla 8: Distribución de los tratamientos del experimento FMKLP

Control	FMKLP
Pollos que consumen agua corriente	Pollos que consumen agua con la FMKLP disuelta en esta.

Los ensayos experimentales *in vivo* se llevaron a cabo en las instalaciones del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA EEA), Laboratorio de Sanidad Aviar - Concepción del Uruguay; fueron realizados en galpones que contaban con jaulas de alambre con pisos de varillas de madera, con comederos individuales y calefaccionados con lámparas infrarrojas para evitar las pérdidas de peso por bajas temperaturas en la primera semana de vida de los pollos. Los galpones donde se alojaron los pollos fueron diseñados con control de corrientes de aire, pero que garantiza la ventilación. Se realizaron controles de humedad y temperatura. Las características descritas se muestran en las siguientes figuras.

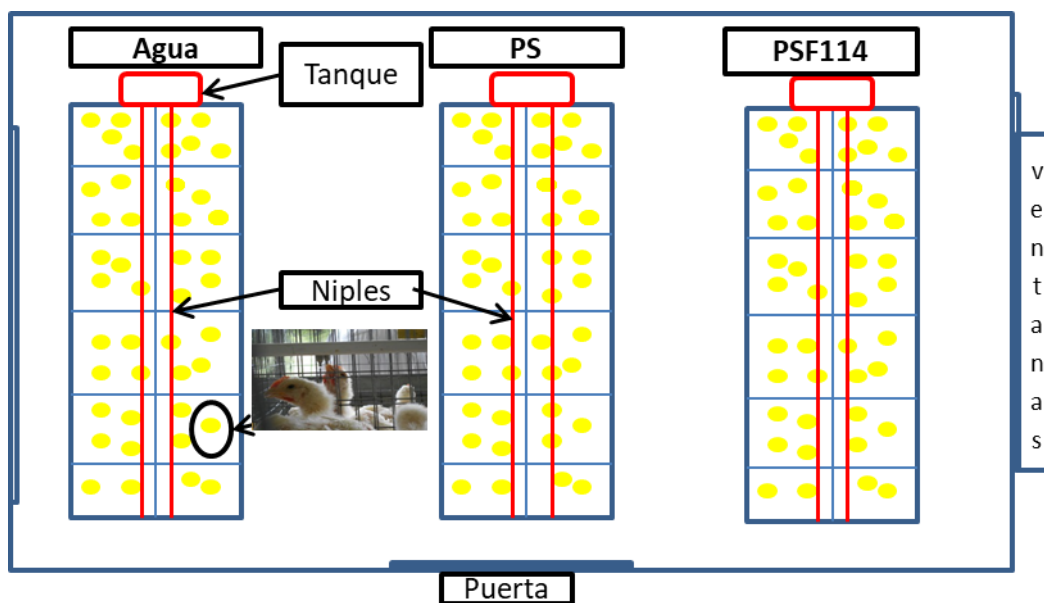
**Figura 3:** Distribución de los grupos experimentales en el ensayo de PSF114 en el galpón.



Figura 4: Galpón experimental Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA EEA) Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina. A) Exterior. B) Interior

2.3 Animales empleados

Se emplearon pollos machos de la línea genética Arbor Acres, vacunados al primer día de vida contra Gumboro, Bronquitis Infecciosa, Marek y Newcastle. Se les suministró un antibiótico preventivo (Microflud Ceft de Vetanco). Todas las aves fueron chequeadas a través del meconio para constatar la ausencia de *Salmonella* sp.

Se inició con un total de 336 animales (8 réplicas por tratamiento con 14 animales cada uno), asignados al azar en un diseño completamente aleatorizado, para disminuir la variación inicial y a los 7 días se redujo 168 animales (8 réplicas por tratamiento con 7 animales cada uno). Los pollos parrilleros machos de 1 día de edad fueron pesados y distribuidos en lotes de promedio y varianza homogénea, descartándose aquellos cuyos pesos se encuentran en los extremos de la distribución. Fueron alojados en jaulas de alambre con pisos de varillas de madera con comederos individuales y fueron calefaccionados con lámparas infrarrojas, estas características se puede ver en las figuras 5, 6 y 7. Se les administró agua y alimento *ad libitum*, excepto en los días de pesaje en los que se les privó de alimento por un período de 2 horas antes de pesarlos. Los animales fueron alimentados con alimento balanceado. Durante los primeros 10 días de vida se utilizó alimento preiniciador y luego este mismo con menor nivel de proteínas.

El agua fue evaluada semanalmente en su contenido de cloro y pH mediante kits comerciales (Merck®, Alemania) y la carga bacteriana por siembra en agar Plate Count (Acumedia®, Estados Unidos).

A los días 7, 14 y 21 se sacrificaron 2 animales/réplica/tratamiento, es decir, un total de 16 animales/tratamiento para realizar las determinaciones descritas a continuación.

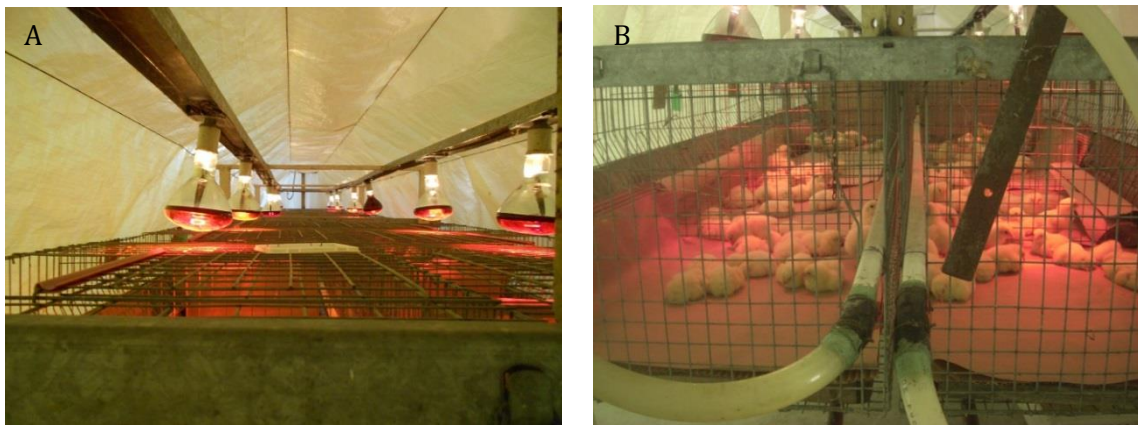


Figura 5: Lámparas infrarrojo para calefacción durante la primera semana de vida de los pollos parrilleros. A) Arriba de la jaula; B) Adentro de la jaula.



Figura 6: Sistema de distribución de agua. A) Tanque de 10l por grupo de jaulas. B) Nipples



Figura 7: Comederos de las jaulas. A) Comederos B) Pollos con comida *ad libitum*

Una vez iniciados los experimentos se realizaron en cada uno de ellos los análisis que se describen a continuación.

3.2.4 Parámetros productivos y factor de eficiencia productiva (FER)

Los signos de morbi-mortalidad de los animales se monitorearon diariamente. Semanalmente, se registraron los parámetros productivos: peso, consumo, conversión alimenticia y factor de eficiencia productiva (FER) por grupo de tratamiento (Poultry Performance Plus 2017):

$$FER = \frac{(A \times B)}{(C \times D)} \times 100$$

Dónde:

A: peso corporal (Kg)

B: viabilidad (%)

C: conversión alimenticia

D: días a sacrificio

3.2.5 Contenido de humedad y grasa en hígado

Después del sacrificio de los pollos, los hígados fueron removidos en esterilidad y pesados, posteriormente se llevaron a congelación para su posterior análisis de grasa y humedad. Después de descongelar los hígados el contenido de grasa fue determinado como describe la AOAC 991.36 con una pequeña

modificación. 2g de cada hígado fueron secados durante 72 horas a 60°C, posteriormente se tritura y la grasa fue extraída con éter de petróleo por 6 horas en un equipo de Soxhlet. La grasa fue calculada con la siguiente fórmula (Mendonca y Jensen, 1983):

$$\text{grasa } \% \frac{m}{m} = \frac{W_1 - W_0}{W_L} \times 100$$

W1: Peso de balón+ grasa

W0: Peso del balón

WL: Peso del hígado

3.2.6 Análisis de la translocación de microorganismos en hígado y bazo

Se estudió la capacidad de translocación de *L. plantarum* CIDCA 83114 y de enterobacterias en bazo e hígado. Se homogenizó una porción de cada órgano, en proporción 1/10 en caldo MRS y agua de peptona al 0,1% p/v. Se realizaron siembras por estrías en agar MRS, YGC incubados a 30°C durante 48 horas y Mc Conkey incubados a 37°C durante 24 horas.

3.2.7 Recuento diferencial de leucocitos

Se extrajo sangre de la vena braquial y se extendió sobre un portaobjetos de vidrio. Cada frotis se tiñó con May-Grünwald (Biopack®, Buenos Aires, Argentina) y Giemsa (Biopur®, Argentina). Un centenar de leucocitos fueron contados bajo el microscopio óptico (Leica®, 1000 DM, Suiza), diferenciándolos en granulocitos (heterófilos, eosinófilos y basófilos) y agranulocitos (linfocitos y monocitos) con el fin de calcular su porcentaje de contenido. Además, se calculó la relación de heterófilos con los linfocitos (relación H / L).

3.2.8 Análisis bioquímico de suero

Previo al sacrificio de las aves, se tomaron 8 ml de sangre en tubos de vidrio. En el suero se determinaron proteínas totales (TP), albúmina (Alb), urea y creatinina mediante el método colorimétrico, utilizando el kit comercial (Wiener Lab®, Rosario, Argentina). Se calculó la fracción total de globulina (Glob), restando

la albúmina de la proteína total, y la relación de Alb / Glob. También se determinaron los niveles de aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), la gamma-glutamilttransferasa (GGT) por un método colorimétrico, de acuerdo con Reitman y Frankel (1957).

3.2.9 Análisis histopatológico de intestino e hígado

Las muestras una vez extraídas fueron conservadas en etanol 96% v/v para su procesamiento. La tabla 9 describe el proceso de obtención de los tejidos, y posterior observación.

Tabla 9: Tren de deshidratación y obtención de cortes histológicos

Deshidratación		
Solvente	Numero de baños	Tiempo
Etanol 70°	3	10 min
Etanol 96°	3	10 min
Etanol 100°	4	10 min
Xileno	3	10 min
Inclusión		
Parafina	1	6 hora a 57°C
Parafina	1	6 hora a 57°C
Se realizó un último baño de parafina en el molde definitivo y se llevó a refrigeración para fijar la muestra. Se realizaron los cortes con micrótopo (Leica® SM 2000 R), con un espesor de 5µm.		
Desparafinado		
Xileno	3	5min
Etanol absoluto	2	2min
Etanol 96	2	2min
Etanol 80	1	2min
Agua destilada	1	1min
Coloración		
Hematoxilina	1	5min
Se lavó con agua corriente y luego con agua destilada		
Eosina	1	1min
Etanol 70	1	Rápidamente
Etano 96	2	2min
Etanol absoluto	2	2min
Xilol	2	2min
Una vez finalizada la coloración, las muestras se secaron durante 5 min. Se agregó una gota de bálsamo de Canadá (Anedra, Dinamarca) sobre la muestra coloreada y se cubrió con cubreobjetos, se esperó que estuviera fijado para su observación en microscopio Leica® DM500 (Alemania).		

3.2.10 Análisis de diversidad microbiana del contenido cecal mediante Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

3.9.10.1 Obtención de ADN a partir de contenido intestinal y materia fecal

Quinientos miligramos (500 mg) de contenido intestinal/materia fecal fueron colocados en 1 ml de buffer PBS. A partir de dicha suspensión se procedió a la extracción del ADN genómico utilizando un kit comercial específico para este tipo de muestra (AccuPrep Stool ADN Extraction kit, BIONEER, Korea). Para ello se siguieron las instrucciones descriptas por el fabricante. El ADN obtenido se almacenó en tubos ependorf libres de ADN a -20 °C hasta su uso.

3.9.10.2 Determinación de la concentración de ADN

La concentración y calidad del ADN fue determinada por medida de la absorbancia a 260, 280 y 234 nm, usando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific Nano Drop 2000 spectrofotometer, USA).

Se determinaron las absorbancias de soluciones diluidas (1/10 a 1/100 a partir de la solución stock) asignando las mismas del siguiente modo: A_{234} a péptidos y aminoácidos aromáticos, A_{260} a ADN y ARN y A_{280} a proteínas y ARN. Se consideró puro al ADN si la relación $A_{260}/280$ presentó valores entre 1,8 y 2,2.

Para calcular la concentración de la solución stock se utilizó la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}] \text{ en } \mu\text{l/ml} = A_{260} \times 5.000$$

La solución de trabajo se preparó a una concentración de 100 ng μl^{-1} y se almacenó a -20 °C.

3.9.10.3 Amplificación del ADNr 16S

Se amplificó la región V3 del gen que codifica para el ARNr 16S, utilizando los oligonucleótidos sintéticos 518R/341F-GC con las secuencias que se indican en la tabla a continuación

Tabla 10: Secuencia de los cebadores 518R/341F

Nombre	Secuencia	Tamaño	Referencia
518R	518R (5'ATTACCGCGGCTGCTGG- 3')	193 pb	Muyzer
341F-GC	341F (5VCCTACGGGAGGCAGCAG- 3V) con 5' GC (5' CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGGCACGG GGGG- 3')		<i>et al.</i> , 1993

3.9.10.4 Electroforesis en gel de acrilamida con gradiente desnaturizante (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)

Los amplicones evaluados mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (denaturing gradient gel electrophoresis: DGGE) fueron los obtenidos por amplificación de un ADN molde con oligonucleótidos ricos en GC (518R/341F-GC).

Soluciones de trabajo

Solución de Acrilamida-Bisacrilamida 40%

Acrilamida.....38,93 g

Bisacrilamida.....1,07 g

Agua destilada.....c.s.p 100 ml

Filtrada a través de un filtro de 0,45 µm y conservada a 4 °C.

Buffer muestra

Azul de bromofenol 2%.....0,25 ml

Xileno cianol 2%0,25 ml

Glicerol 100%.....7,00 ml

Agua destilada.....2,50 ml

Solución de tñido

Sybr Gold (Invitrogen).....30 µl

Buffer TAE.....300 µl.

Preparada en el momento de ser utilizada y conservada al reparo de la luz.

Gel apilador

Acrilamida/Bisacrilamida 40 %.....5 ml

Temed.....5 μ l

Persulfato de amonio 10 %.....5 μ l

Tabla 11: Composición de las soluciones 0 y 80% desnaturizantes

Reactivos	Solución 0% desnaturizante	Solución 80% desnaturizante
Acrilamida-Bis 40%	20 ml	20 ml
<i>Buffer</i> TAE 50X	2 ml	2 ml
Urea	-	33,6 g
Formamida deionizada	-	32 ml
Agua destilada	c.s.p 100 ml	c.s.p 100 ml

Protocolo:

Para el armado de los geles se utilizaron dos vidrios perfectamente limpios y secos, uno pequeño y uno grande. El vidrio grande se recubrió con una goma y se colocaron separadores en la parte interior del vidrio tratando de minimizar el espacio que los separa. Los separadores fueron previamente embebidos en grasa con el objetivo de disminuir efectos provocados por la corriente y que deforman el gel (*smile*). Luego, se colocó el vidrio pequeño sobre el vidrio grande y ambos se ajustaron con seis broches. Se constató que el sistema no tenga pérdidas introduciendo agua en el mismo. Luego se vació y escurrió sobre papel de filtro.

En la tabla 12 se presentan los volúmenes de las soluciones desnaturizantes 0 y 80 % necesarios para obtener soluciones desnaturizantes 40 y 60 %. Antes de comenzar a formar el gradiente, se les adicionó 4,4 μ l de Temed y 44 μ l de

persulfato de amonio 10% y se agitó. Luego se procedió a la formación de los geles en gradiente.

Tabla 12: Volúmenes de las soluciones desnaturalizantes 0 y 80 % necesarios para obtener soluciones desnaturalizantes 40 y 60 % de urea/formamida

Concentración desnaturalizante (%)	Solución 0% desnaturalizante * (ml)	Solución 80% desnaturalizante* (ml)
40	5,75	5,75
60	2,87	8,63

*Volúmenes necesarios para la preparación de 11,5 ml de cada solución.

El gradiente desnaturalizante se formó utilizando un sistema de vasos comunicantes y bomba de vacío. Los vasos comunicantes se colocaron sobre un agitador magnético y se introdujo un buzo magnético en el vaso más cercano al orificio de salida que contendrá la solución de mayor concentración de agente desnaturalizante. Se verificó que la comunicación entre los vasos esté cerrada y se introdujeron ambas soluciones. Finalmente se colocó una manguera entre el orificio de salida de los vasos y el espacio entre el sistema de vidrios. Se procedió a encender la bomba de vacío, se abrió la comunicación entre vasos y comenzó a formarse el gel en gradiente. Se emplearon velocidades de formación del gel lo más lentas posible y las mismas fueron constante para los distintos geles de modo tal de lograr reproducibilidad.

Luego, se colocó el peine y se dejó polimerizar. En los casos en que los geles se contrajeron y quedaron espacios vacíos se completó el volumen con gel de apilamiento. Una vez polimerizados, se retiraron los peines y se procedió al montaje de los geles sobre los soportes. El equipo consta de dos soportes con una capacidad de cuatro geles por corrida. Cada uno soporta dos geles que se montan con broches plásticos. Una vez armados los soportes se procedió a liberar la zona de la base del gel quitando la goma contenedora de manera tal que la corriente

pueda circular. El sistema se introdujo dentro de la cuba previamente cargada con buffer TAE y precalentada a 60 °C. Se encendió el sistema de recirculación de líquido del equipo y se procedió a la siembra de las muestras.

Previo a la siembra las muestras fueron combinadas con un volumen de buffer muestra (25 µl de muestra + 5 µl de buffer muestra) y luego sembradas con jeringa Hamilton. El equipo se conectó a una fuente a 100 V de modo que la corriente que pase por cada gel sea de aproximadamente de 35 mA. Las corridas electroforéticas fueron de 16 horas a 60 °C. Se utilizó un equipo DGGE-2401 C.B.S (C.B.S. Scientific Co., Del Mar, CA, USA) con geles de 15 x 20 x 0,75 cm de tamaño. Una vez finalizada la corrida electroforética, los geles fueron incubados en la solución de teñido (Sybr Gold, Invitrogen, USA) en oscuridad durante 30 minutos. Las bandas se observaron con luz UV en un transiluminador (Labnet®, DyNA Light Dual intensity UV, Estados Unidos).

4. Análisis estadístico

Todos los parámetros se analizaron con el programa Graph Pad Prism. Los resultados de tres ensayos independientes se presentan como los valores medios y sus correspondientes desviaciones estándar (SD). Se analizaron diferencias significativas en la cinética de crecimiento mediante el análisis de varianza (ANOVA), T de student empleando un nivel de significación $p < 0,05$.

El análisis filogenético se realizó con el programa MEGA 6.0® y el análisis de los geles de Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) se analizó por medio del programa Gel Compro II®.

Capítulo I

Fermentación de permeado de suero por microorganismos de kefir

Introducción

El permeado de suero (PS) es un efluente de la industria láctea que queda después de la desproteinización del lactosuero. Por su alto contenido de lactosa es un importante contaminante, el aprovechamiento de este subproducto puede contribuir a reducir el problema del impacto ambiental que genera la industria láctea generando, a su vez un producto con valor agregado, un ejemplo de esto es el uso de biocatalizadores para obtener otros productos a partir de los azúcares contenidos (Illanes 2011). El permeado de suero puede ser empleado para producir jarabes edulcorantes mediante hidrólisis e isomerización enzimáticas (Chiu & Kosikowski 1985; Coté et al. 2004). Debido a su elevado contenido de lactosa también puede usarse como materia prima para la producción de oligosacáridos no digeribles derivados de lactosa (NDOs) potencialmente prebióticos, tales como lactitol, ácido lactobiónico, lactosacarosa, tagatosa, lactulosa y galacto-oligosacáridos (GOS) (Santos et al. 2014; Hugo et al. 2016). También se podría utilizar como sustrato para la fermentación por diferentes cultivos iniciadores como bacterias lácticas o cultivos más complejos como el kefir (Gamba et al. 2015b; León Peláez 2013).

Existe evidencia de la capacidad que tienen los gránulos de kefir y sus cepas aisladas de producir sustancias antimicrobianas, entre las cuales se incluyen los ácidos orgánicos, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, etanol, diacetilos y diversos péptidos y bacteriocinas (Caplice & Fitzgerald 1999; Farnworth 2003; Garrote et al. 2000; Kotova et al. 2016) que además de disminuir o prevenir desórdenes gastrointestinales y patologías, pueden usarse como conservantes durante la producción y almacenamiento de alimentos evitando el deterioro o la contaminación. Algunos de estos componentes tienen actividad antifúngica. Generalmente son aquellos de bajo peso molecular como los ácidos orgánicos, el peróxido de hidrógeno y algunos compuestos fenólicos (Guimarães et al. 2018a; Sangmanee & Hongpattarakere 2014; Sjögren et al. 2003; Caro Velez & León Peláez 2015). Los ácidos orgánicos, principalmente el ácido láctico y acético son los principales productos de la fermentación de los carbohidratos por medio de las bacterias lácticas. Es bien sabido que el efecto antimicrobiano de estos ácidos

orgánicos es causado por la acción de la fracción no disociada del ácido en lugar de los iones de hidrógeno. Esto se debe a la porción no disociada de ácido débil que, en su estado no cargado, tiene una mayor capacidad para penetrar las células fúngicas que los productos de disociación (Giannuzzi et al. 1999). Otros autores también han descrito la capacidad de *L. plantarum* de producir compuestos fungicidas y han sugerido su utilización en la elaboración de masas para panificados buscando aumentar la vida útil de los productos (Dal Bello et al. 2007; Gamba et al. 2016a; Gerez et al. 2013; Lavermicocca et al. 2000; León Peláez 2013) y para biopreservar vegetales frescos (Sathe et al. 2007). Otros estudios han demostrado la capacidad de los gránulos de kefir y sus cepas aisladas de fermentar sustratos limitados en nutrientes como el suero y el permeado de suero, produciendo ácidos orgánicos con capacidad antifúngica (Gamba et al. 2016b; León Peláez 2013; Londero et al. 2014). Sin embargo, no todas las cepas aisladas a partir del kefir tuvieron las mismas capacidades, demostrando que esta característica es cepa dependiente. Por esta razón, este capítulo se enfocó en estudiar el crecimiento de los microorganismos seleccionados, por sus propiedades antifúngicas, en permeado de suero. Además, se caracterizó el permeado de suero fermentado en cuanto a su composición de ácidos orgánicos.

Objetivos:

- ❖ Estudiar el potencial del gránulo de kefir CIDCA AGK1 y de cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas de kefir como cultivos iniciadores para la fermentación de permeado de suero
- ❖ Analizar la capacidad fermentativa por medio del descenso del pH y la producción de ácidos orgánicos.

Resultados y discusión

1. Selección, fermentación y crecimiento de microorganismos aislados de kefir en permeado de suero

Se utilizaron cuatro cepas de *L. plantarum* de la colección del cepario del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA): *L. plantarum* CIDCA 83114, *L. plantarum* CIDCA 8316 *L. plantarum* CIDCA 8329, *L. plantarum* CIDCA 8346 y el gránulo de kefir entero CIDCA AGK1. Las cepas de *L. plantarum* y el gránulo de kefir fueron seleccionadas en base a su capacidad, demostrada previamente, de reducir la germinación de conidios de diferentes hongos y de secuestrar aflatoxinas, entre otras propiedades. Los porcentajes de reducción de la germinación de conidios se muestran en la Tabla 1 (Gamba 2015; León Peláez 2013).

Tabla1: Porcentaje de reducción de la germinación de hongos filamentosos con sobrenadantes de *L. plantarum* y gránulos CIDCA AGK1

Cepa		<i>Aspergillus flavus</i> AFUNL5	<i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 2999	<i>Penicillium sumatrense</i> CMUNLP3
	Origen	Cereales ^c	Colección	Alimento ^d
<i>L. plantarum</i> CIDCA83114 ^a	Gránulo CIDCA AGK1	75,6%	79,5%	80.1%
<i>L. plantarum</i> CIDCA8316 ^a	Gránulo CIDCA AGK1	63.9%	67,2%	77,2%
<i>L. plantarum</i> CIDCA8329 ^a	Gránulo CIDCA AGK2	59,1%	54,5%	66.1%
Gránulo CIDCA AGK1^b	Colección cepario CIDCA	90%	83%	87%

^aSobrenadante obtenido de la fermentación del PS con cepas aisladas de gránulos de kefir.^b Sobrenadante obtenido a partir de la fermentación del PS con gránulo de kefir CIDCA AGK1 (Gamba 2015; León Peláez 2013) ^c Aislado de cereales, donado por la Universidad Nacional de Litoral. ^d aislados de alimentos para pollos por León Peláez (2013 Los porcentajes se calcularon siguiendo la fórmula de Onilude et al. 2005.

Debido a los altos valores de reducción de la germinación, se decidió emplear las tres cepas mencionadas de *L. plantarum* y el gránulo de kefir CIDCA AGK1 en los estudios que se describen a continuación. Por otra parte se incluyó en

los estudios una cepa más de *L. plantarum*, CIDCA 8346, que hasta el momento del desarrollo de este trabajo no había sido evaluada como cepa antifúngica, ni con capacidades de captura de aflatoxinas. Esta cepa fue estudiada por Golowczyc et al. (2008), entre otros lactobacilos homofermentativos facultativos, y presenta características de gran interés para ser suministrada posteriormente a pollos, como un elevado porcentaje de adherencia a células epiteliales *in vitro*.

Los primeros ensayos se realizaron a fin de estandarizar las condiciones de crecimiento y de capacidad fermentativa tanto de los microorganismos aislados como del gránulo de kefir CIDCA AGK1 en permeado de suero (PS).

1.1 Crecimiento y recuentos de las cepas de *Lactobacillus plantarum* seleccionadas

Estudios previos en nuestro grupo de trabajo han demostrado que el PS, efluente de la industria láctea, es un medio de cultivo que puede ser utilizado para el crecimiento de distintos microorganismos como bacterias lácticas y levaduras presentes en gránulos de kefir (Gamba 2015, León-Peláez 2013). Sin embargo, a los efectos de realizar un proceso más eficiente y económico, teniendo en cuenta que este producto fermentado se utilizara como suplemento dietario de pollos parrilleros, fue necesario optimizar el crecimiento de los microorganismos seleccionados en el PS utilizado durante todo este estudio (Arla foods®). En este estudio se determinó si las cepas de *L. plantarum* tenían capacidad de crecer en PS sin la presencia de MRS en el medio.

Se comparó el crecimiento máximo obtenido en caldo MRS, con aquellos obtenidos en PS. Se utilizaron tres condiciones de cultivo de las cepas de *L. plantarum* en PS. En todos los casos el repique final se realizó al 2% v/v, las tres condiciones se incubaron 48h a 30°C.

1. Los microorganismos se reactivaron en MRS mediante dos pasajes sucesivos. Seguidamente se repicaron en MRS, medio en el cual se hizo la incubación y el recuento final (condición empleada como control).

2. Los microorganismos se reactivaron en MRS mediante dos pasajes sucesivos, seguidos de un repique en PS, medio en el cual se hizo la curva de crecimiento y el recuento final.
3. Los microorganismos se reactivaron en MRS mediante dos pasajes sucesivos. Del segundo repique se obtuvo un pellet el cual se resuspendió en PBS, a fin de eliminar los residuos del medio de cultivo anterior. Esta suspensión se repicó en PS, medio en el cual se hizo la curva de crecimiento y el recuento final.

En la tabla 2 se pueden observar los recuentos obtenidos para las cuatro cepas de *L. plantarum* evaluadas, a las 24 y 48 horas de incubación y de acuerdo a cada uno de los procedimientos empleados (1, 2 o 3).

Tabla 2: Concentración de las cepas de *L. plantarum* en los cultivos MRS (1), MRS-PS (2), PBS-PS (3), expresada en UFC/ml.

<i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 83114			
Tiempo (hs)	MRS (1)	MRS-PS (2)	PBS-PS (3)
0	1,2x10 ⁸ ± 7,8x10 ⁷ A	7,5x10 ⁷ ±2,45x10 ⁷ A	5,33x10 ⁷ ±1,04x10 ⁷ A
24	1,2x10 ¹⁰ ±5,7x10 ⁹ B, a	1,6x10 ⁸ ±3,6x10 ⁸ B, b	1,28x10 ⁸ ±1,15x10 ⁸ A, b
48	1,6x10 ¹⁰ ±8,3x10 ⁹ B, a	3,9x10 ⁹ ±6,7x10 ⁸ C, b	1,83x10 ⁸ ± 1,0x10 ⁸ A, c
<i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 8316			
0	5,9x10 ⁸ ± 6,98x10 ⁷ A	7,2x10 ⁷ ± 1,4x10 ⁷ A	6,9x10 ⁷ ± 3,9x10 ⁷ A
24	1,9x10 ¹⁰ ± 1,2x10 ¹⁰ B, a	1,3x10 ⁸ ±2,36x10 ⁸ A, b	8,6x10 ⁷ ± 4,5x10 ⁷ A, b
48	3,9x10 ¹⁰ ±1,5x10 ¹⁰ B, a	3,57x10 ⁹ ± 1,9x10 ⁹ B, a	1,8x10 ⁸ ± 5,9x10 ⁷ A, b
<i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 8329			
0	6,9x10 ⁷ ± 3,7x10 ⁷ A	7,8x10 ⁷ ± 9,0x10 ⁶ A	5,0x10 ⁷ ± 2,9x10 ⁷ A
24	1,7x10 ¹⁰ ± 1,3x10 ¹⁰ B, a	1,2x10 ⁸ ± 6,9x10 ⁷ B, b	1,0x10 ⁸ ± 1,3x10 ⁷ A, b
48	3,2x10 ¹⁰ ± 2,7x10 ¹⁰ C, a	1,93x10 ⁹ ±8,74x10 ⁸ C, b	1,9x10 ⁸ ± 7,6x10 ⁷ B, c
<i>Lactobacillus plantarum</i> CIDCA 8346			
0	5,3x10 ⁷ ± 1,1x10 ⁷ A	9,9x10 ⁷ ±1,9x10 ⁷ A	5,1x10 ⁷ ± 2,3x10 ⁷ A
24	2,8x10 ¹⁰ ± 1,9x10 ¹⁰ B, a	1,2x10 ⁸ ±3,81x10 ⁷ A, b	1,3x10 ⁸ ± 4,5x10 ⁷ A, b
48	4,1x10 ¹⁰ ± 3,4x10 ¹⁰ B, a	3,0x10 ⁹ ± 6,5x10 ⁸ B, b	1,6x10 ⁸ ± 6,5x10 ⁷ A, c

Recuentos realizados a las horas cero, 24 y 48 del cultivo en diferentes condiciones de inoculación en permeado de suero a 30°C. ^{A,B,C} Letras mayúsculas diferentes en una misma columna indican diferencias significativas en los recuentos obtenidos a las diferentes horas de incubación. ^{a, b, c} Letras minúsculas diferentes en una misma fila representan diferencias significativas en los recuentos obtenidos con las diferentes condiciones. Test ANOVA $\alpha < 0.05$

Los recuentos correspondientes a tiempo 0 indican el número de microorganismos viables iniciales en cada medio después de diluir el cultivo proveniente del medio MRS.

El recuento máximo se obtuvo en MRS (1) encontrándose valores de dos órdenes mayores que en las demás condiciones. Dado que la condición (1) permitió obtener la cosecha máxima de microorganismos se empleó dicha condición como parámetro de comparación.

Respecto del tiempo de incubación, en MRS se encontró diferencia significativa en el número de microorganismos viables, entre las horas 24 y 48, en el caso de *L. plantarum* CIDCA 8329. Por el contrario, no se hallaron diferencias significativas en los recuentos en MRS correspondientes a las horas 24 y 48 del resto de los *L. plantarum* analizados.

En el caso de la condición (2), se observó crecimiento microbiano durante la incubación. *L. plantarum* CIDCA 83114 y 8329 presentaron diferencias significativas en los recuentos desde la hora 24. Todos los microorganismos alcanzaron el máximo recuento a la hora 48.

Los recuentos obtenidos en la condición (3) no presentaron un aumento significativo durante el tiempo de incubación, excepto *L. plantarum* CIDCA 8329, el cual mostró un número de microorganismos viables significativamente mayor a la hora 48.

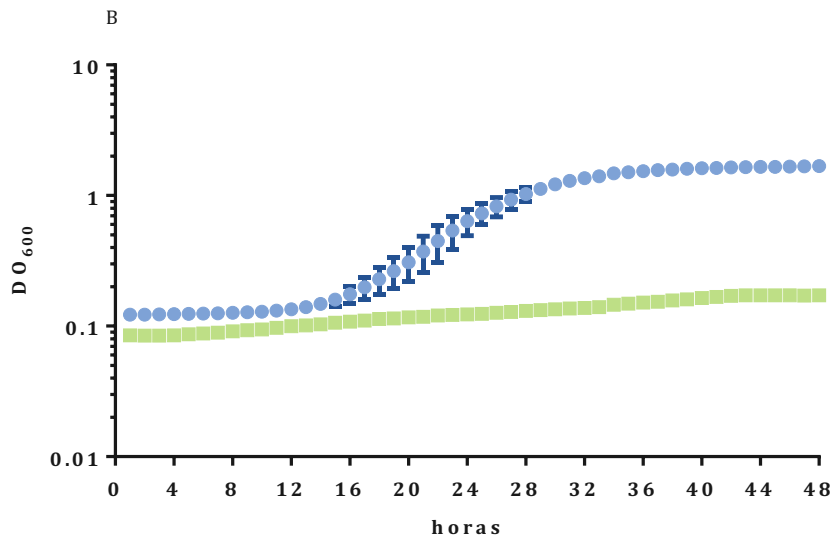
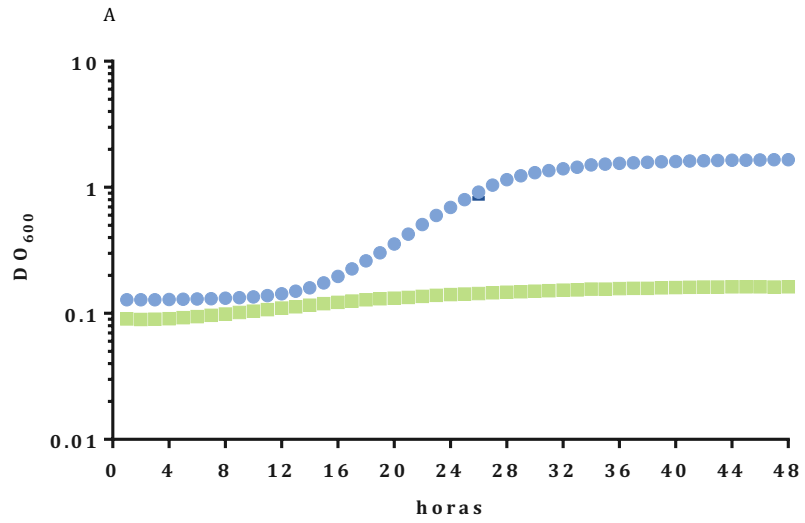
Todas las cepas de *L. plantarum* utilizadas demostraron capacidad de crecer en la condición (2), incrementando el número de microorganismos viables en dos órdenes respecto al recuento inicial.

En la condición 3, en la cual se hizo un pasaje intermedio en PBS entre el cultivo en MRS y PS, los recuentos no presentaron diferencia significativa entre el inóculo inicial y la hora 48, indicando que no es una condición adecuada para el crecimiento de los lactobacilos. Estos microorganismos para su crecimiento requieren nitrógeno orgánico en forma de aminoácidos o péptidos, entre los cuales el ácido glutámico, isoleucina y valina son considerados factores de crecimiento y deben estar presentes en el medio de cultivo (Károvičová & Kohajdová 2003). En efecto, el PS tiene una concentración de azúcares alta y un bajo contenido de compuestos nitrogenados. El PS de Arla Foods contiene lactosa 70,8 %,p/p cenizas 5,1% p/p y proteínas 0,0018 % p/p (Bruno 2016), lo que indica que en dicho medio los microorganismos tienen una fuente de carbohidratos para fermentar pero no disponen de fuentes de nitrógeno suficientes para su crecimiento. En el caso de la condición MRS-PS (2), se pudo observar que los microorganismos crecieron durante las 48 horas de incubación. Dado que el PS fue inoculado directamente con los microorganismos cultivados en el caldo MRS habrían

arrastrado consigo nutrientes que complementarían aquellos necesarios para el crecimiento (dilución al 2% del cultivo en MRS).

Los resultados obtenidos indican que para obtener una máxima cosecha de microorganismos empleando el PS como medio de cultivo, debe emplearse la condición (2) durante 48 horas. En coincidencia con estos resultados, existen evidencias de otros estudios que emplean sustratos alternativos al MRS. Se ha evaluado el uso de sustratos de origen vegetal como *Aloe vera* en concentraciones entre 25 y 100% p/v, donde *L. plantarum* alcanza recuentos entre 10^8 y 10^9 UFC/mL, similares a los obtenidos en este estudio con la condición (2) (González et al. 2008). También hay evidencias de la capacidad que tiene *L. plantarum* de fermentar y sobrevivir hasta 60 días en extracto de malta y trigo (Charalampopoulos & Pandiella 2010), y de crecer y fermentar residuos de la industria azucarera constituyéndose en un microorganismo con potencial para la industria del biodiesel (Krzywonos & Eberhard 2011). Otro estudio que usó coles como fuente de fermentación concluyó que *L. plantarum* ATCC 8014 tiene capacidad para crecer en este medio alcanzando una concentración de 10^9 UFC/ml luego de 36 horas de fermentación (Jaiswal et al. 2012). Existe también evidencia del uso de estos microorganismos para la fermentación de suero de queso hidrolizado, donde *L. plantarum* CECT-22 produce bacteriocinas, ácido láctico y ácido acético en el proceso de fermentación (Rodríguez-Pazo et al. 2016). Todas estas evidencias permiten concluir que *L. plantarum* es un microorganismo versátil y con gran potencial para ser empleado en la fermentación del PS suplementado.

Una vez elegida la condición MRS-PS (2) se procedió a determinar la fase de latencia y el tiempo de cosecha máxima. Para ello se analizó la cinética de crecimiento de cada microorganismo determinando la DO a 600nm en función del tiempo durante 48 horas. A modo de control se realizó la lectura de la DO en la condición 3 PBS-PS (Figura 1).



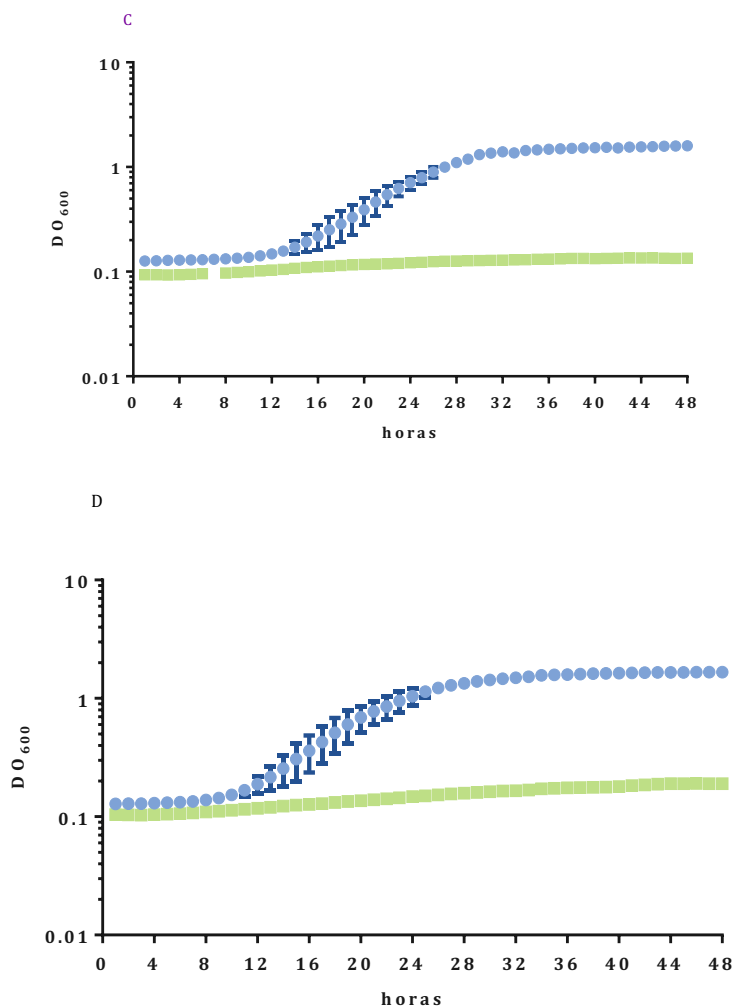


Figura 1: Cinética de crecimiento de *L. plantarum* en las condiciones MRS-PS (2): ● y PBS-PS (3): ●, a 30°C. A) *L. plantarum* CIDCA 83114; B) *L. plantarum* CIDCA 8316; C) *L. plantarum* CIDCA 8329; D) *L. plantarum* CIDCA 8346. Se muestran los datos correspondientes a la media de dos experimentos independientes.

En la figura 1 se observa que las cuatro cepas presentan un tiempo de latencia aproximado de 15 horas y un tiempo de cosecha máxima entre las 28 y 32 horas. Las mediciones obtenidas en la condición PBS-PS (3) corroboran la limitación en el crecimiento microbiano. Los tiempos 28 a 32 horas fueron seleccionados para la incubación de los microorganismos en los subsiguientes experimentos.

Los resultados hasta aquí presentados indican que las cepas de *L. plantarum* estudiadas, pueden ser cultivadas en medios económicos como el permeado de suero, dado que pueden aprovecharlos para su crecimiento y producción de metabolitos. No obstante, se requiere el aporte que da el medio de cultivo anterior (MRS) para poder crecer en esta condición.

Prado et al. 2015, describieron que *L. plantarum* tiene capacidad de producir metabolitos antimicrobianos en sustratos de origen animal, como los derivados lácteos. En base al crecimiento obtenido en PS y la posibilidad de encontrar metabolitos antimicrobianos se decidió continuar con la caracterización del proceso fermentativo mediante la evaluación de las cinéticas de acidificación y el estudio de la producción de ácidos orgánicos.

1.2 Cinética de acidificación del permeado de suero fermentado con cepas de *Lactobacillus plantarum*

El descenso en el pH del medio es un factor importante para controlar el crecimiento de patógenos, pues como se indicó anteriormente muchos microorganismos son inhibidos a pH bajos (Hajela et al. 2012). Los productos fermentados naturalmente se han empleado para biopreservación, lo cual se define como el control de un microorganismos por otro (Stiles 1996). El principal efecto de las bacterias lácticas en la preservación se debe a la producción de ácido láctico, el cual disminuye el pH, inhibiendo así a numerosos microorganismos (Brul & Coote 1999). Además de ácido láctico, las bacterias lácticas producen otras sustancias antimicrobianas, tales como ácido acético, etanol, peróxido de hidrógeno, diacetilo, reuterina, reuteriicina y bacteriocinas, que juegan un importante rol en su capacidad de actuar como perseverantes (Hugo et al. 2010; Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn 2010; Schnürer & Magnusson 2005).

Dado el interés que genera la posibilidad de controlar el crecimiento fúngico empleando productos fermentados naturalmente, se evaluó la capacidad de las cepas *L. plantarum* de acidificar el PS. Este microorganismo es capaz de metabolizar la lactosa obteniendo ácido láctico como producto principal y cuya producción está asociada a su crecimiento (Frizzo et al. 2011; Fu & Mathews 1999). Con el fin de determinar la capacidad de acidificación de *L. plantarum*, se realizaron cinéticas de acidificación en las condiciones MRS-PS (2) y PBS-PS (3). Adicionalmente, se determinó la concentración de ácido láctico, acético, propiónico y butírico en los productos fermentados mediante HPLC. En la figura 2 se observan las cinéticas de acidificación durante 48 horas de las cepas de *L. plantarum* seleccionadas, con los tratamientos (2) y (3) respectivamente.

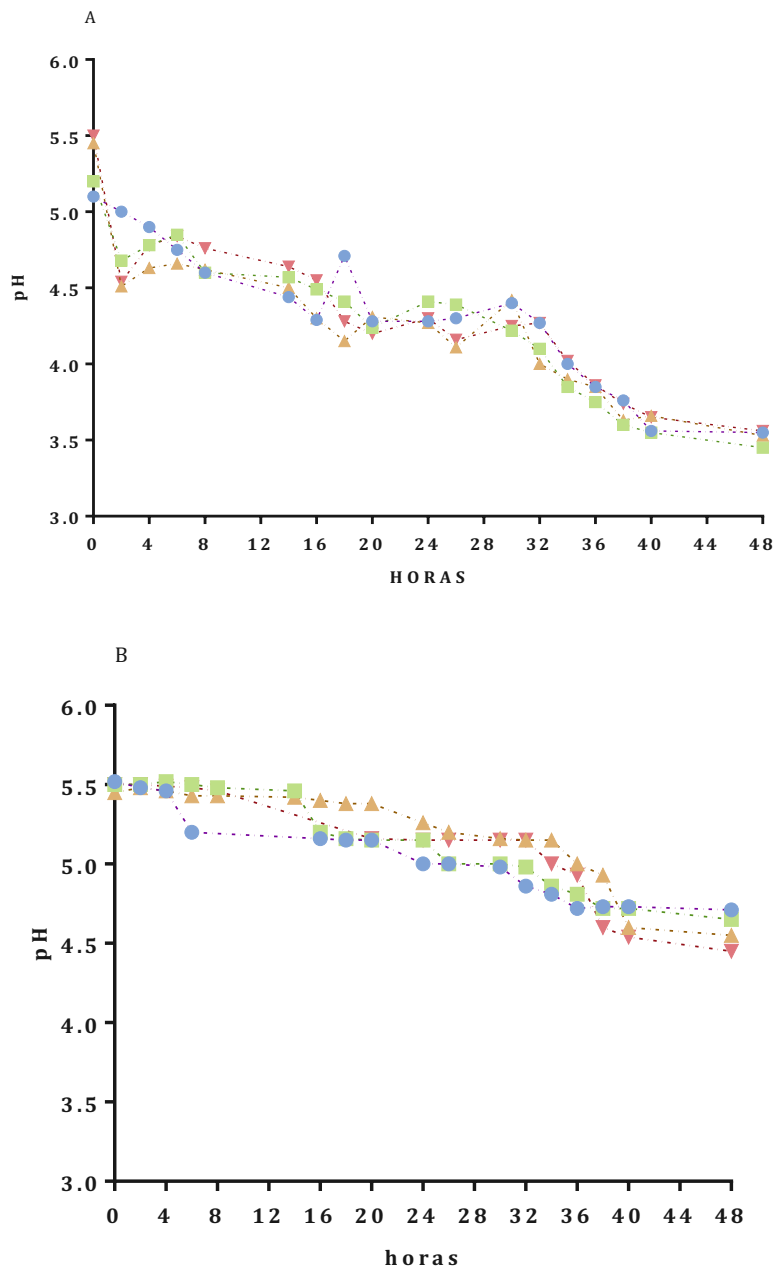


Figura 2: Cinética de acidificación de *L. plantarum* en los tratamientos A) MRS-PS (2) y B) PBS-PS (3). ● *L. plantarum* CIDCA 83114; ■ *L. plantarum* CIDCA 8316; ▲ *L. plantarum* CIDCA 8329; ▼ *L. plantarum* CIDCA 8346.

Cuando se analizó la condición de cultivo MRS-PS (2) se observó que todas las cepas evaluadas acidificaron el PS durante las 48 horas de incubación a 30°C. El

pH inicial del medio, alrededor de 5,5, descendió hasta un valor alrededor de 3,5 (Figura 2A).

En la condición PBS-PS (3), presentada en la Figura 2B, todos los microorganismos fermentaron en menor proporción el PS en relación a la condición (2), alcanzando un pH final alrededor de 4,5, lo cual pudo deberse a la menor concentración de microorganismos viables alcanzada, un orden por debajo de la condición (2).

La capacidad de *Latobacillus plantarum* aislados de diferentes sustratos de acidificar los medios de cultivo está asociada a la producción de ácidos orgánicos. Dado que la presencia de ácidos orgánicos se asoció con la actividad antifúngica atribuida a las bacterias ácido lácticas (Fernandez et al. 2017; Gamba 2015; León Peláez 2013; Sangmanee & Hongpattarakere 2014; Valerio et al. 2016), se procedió a determinar la presencia de algunos de éstos compuestos mediante HPLC en los productos fermentados con los tratamientos (2) y (3).

1.3 Determinación de ácidos orgánicos por cromatografía líquida de alta eficacia (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Los ácidos orgánicos tales como el ácido láctico y el ácido acético, son algunos de los metabolitos producidos por las bacterias lácticas y a estos se les ha atribuido su función como conservantes. Se ha propuesto que estos compuestos antimicrobianos inhiben el crecimiento de células bacterianas y fúngicas mediante diferentes mecanismos: la disrupción de la membrana plasmática (Bracey et al. 1998; Chen et al. 2014; Yarlagadda et al. 2015), la inhibición de reacciones metabólicas esenciales (Capasso & Supuran 2015; Krebs et al. 1983; Murima et al. 2014) y generación de estrés celular por mantener el pH intracelular (Bracey et al. 1998; Cheng et al. 2015).

Se determinaron las concentraciones de ácido láctico, acético, propiónico y butírico presentes en los productos de la fermentación de las condiciones MRS-PS (2) y PBS-PS (3) con cada cepa de *L. plantarum*.

En las muestras de PS fermentado se obtuvieron picos con tiempos de retención coincidentes con los de los ácidos láctico, acético y propiónico. Para

dichos ácidos se construyeron curvas de calibración a partir de la evaluación de soluciones de los mismos de concentración conocida, tal como se describió en Materiales y Métodos (inciso 1.6). A partir del análisis de los cromatogramas de las muestras y empleando las curvas de calibración, se pudo determinar la concentración de los ácidos. Sin embargo solo fue posible determinar el ácido láctico. La tabla 3 presenta la concentración de ácidos orgánicos en los productos fermentados.

Tabla 3: Acido láctico en PS fermentado con diferentes cepas de *L. plantarum*.

<i>L. plantarum</i> CIDCA (condición)	Ácido láctico (mM)
83114 (2)	31,0 ± 1,0
83114 (3)	12,1 ± 0,5
8316 (2)	32,5 ± 7,5
8316 (3)	11,7 ± 0,5
8329 (2)	33,7 ± 1,3
8329 (3)	8,6 ± 1,0
8346 (2)	35,3 ± 1,8
8346 (3)	5,8 ± 0,2

(2) MRS-PS, (3) PBS-PS. Resultados de dos experimentos independientes. El PS solo también fue medido y no se detectaron ácidos presentes.

Todas las cepas de *L. plantarum* produjeron ácidos en las dos condiciones (2) y (3). Entre los ácidos orgánicos evaluados el producido en mayor proporción por todas las cepas fue el ácido láctico. La concentración de ácido láctico fue menor en la condición (3) en comparación con la condición (2). Esto último se correlaciona con el descenso de pH durante el proceso de fermentación de las mencionadas condiciones. Aun cuando todos los microorganismos produjeron concentraciones similares de ácido láctico, se pudo determinar que *L. plantarum* CIDCA 8346 tuvo la mayor producción, seguido de *L. plantarum* CIDCA 8329 y 83114. Todos los microorganismos presentaron picos a los mismos tiempos de retención del ácido acético y propiónico. No se detectó la presencia de ácido butírico en los productos fermentados por las cepas estudiadas en ninguna de las condiciones.

Los resultados obtenidos coinciden con aquellos obtenidos por Fu & Mathews (1999), quienes determinaron que el ácido láctico es el principal producto obtenido durante la fermentación de la lactosa y a su vez el principal metabolito que causa el descenso del pH en los productos obtenidos empleando *L. plantarum*. Si bien el MRS tiene acetato, como en la condición (3) se produce acético, se puede decir que las cepas de *L. plantarum* producen ácido acético a partir del PS, y este no proviene del MRS.

Las concentraciones de ácido láctico producidas por las cepas de *L. plantarum* utilizadas en este trabajo fueron similares a aquellas reportadas en otras investigaciones. *L. plantarum* UM55 produce 47,73 mM en MRS (Guimarães et al. 2018) y *L. plantarum* ITM21B produce hasta 70,45 mM en un medio modificado (Valerio et al. 2008). *L. plantarum* CIDCA 8327, también aislado de gránulos de kefir, produjo 25,53 mM de ácido láctico y 6,66 mM de ácido acético en suero de queso (Londero 2012). Algunas especies del género *Lactobacillus* son heterofermentativos facultativos; en condiciones de anaerobiosis y microaerobiosis se comportan como homofermentativos, y en condiciones aeróbicas producen ácido acético, acetoina y peróxido de hidrógeno además de ácido láctico (Pramela et al. 2017; Porro et al., 1999).

Tabla 4: Concentración y porcentaje de ácido láctico no disociados en el PS fermentado con cepas de *L. plantarum* en los tratamientos (2) y (3).

Cepa (<i>L. plantarum</i> CIDCA)	pH	Ácido Láctico ND (mM)	% Ácido Láctico ND
83114(2)	3,6 ± 0,2	18,2± 3,7	58,9 ± 10,2
83114(3)	4,6 ± 0,1	1,7 ± 0,3	14,0 ± 2,4
8316 (2)	3,8 ± 0,2	16,9 ± 2,5	50,9 ± 10,1
8316 (3)	4,4 ± 0,2	2,5 ± 0,4	21,4 ± 8,1
8329 (2)	3,7 ± 0,2	17,8 ± 1,8	52,8 ± 9,7
8329 (3)	4,6 ± 0,1	1,1 ± 0,7	12,6 ± 2,3
8346 (2)	3,8 ± 0,1	18,1 ± 1,0	51,15± 2,5
8346 (3)	4,4 ± 0,2	21,4 ± 1,7	28,0 ±1,5

La concentración de ácidos no disociados (ND) se determinó con la ecuación (3) del inciso 1.5.1 de Materiales y Métodos. El % ND corresponde al % de ácido no disociado calculado sobre su concentración total.

La proporción de ácidos en el PS fermentado es importante ya que estos tienen una acción antifúngica a pH ácidos. El efecto antifúngico aumenta a medida que el pH disminuye con respecto al pKa del ácido, donde se favorece la forma no disociada del ácido, condición en la que puede ser más útil para la inhibición fúngica (León Peláez et al. 2012; Caro Velez & León Peláez 2015; Yang & Chang 2010). A fin de determinar la concentración efectiva del ácido con función antifúngica, se calcularon las concentraciones de ácidos no disociados (ND) al pH final de la fermentación.

En la tabla 4 se presentan las concentraciones ácido láctico no disociados no disociados contenidos en el PS fermentado con las cepas de *L. plantarum* estudiadas. Asimismo, en la tabla se incluyó el porcentaje no disociado (ND). La mayor concentración de ácido orgánico ND estuvo presente en la condición (2). Las concentraciones de ácido acético ND y propiónico ND fueron inferiores a la correspondiente al ácido láctico ND, dado que hay menor concentración total de estos en los productos fermentados. El porcentaje de ácido láctico ND resultó de alrededor del 50% en la condición (2), dado que el pH final de los productos fermentados estuvo cerca de su pKa (3,75). En el caso de la condición (3) el

porcentaje de ácido láctico ND estuvo alrededor del 10%, dado que el pH resultó más alto que su pKa.

A partir de estas determinaciones se pudo concluir que todas las cepas de *L. plantarum* estudiadas pueden ser utilizadas para la producción de ácido láctico en PS en la condición (2), principalmente *L. plantarum* CIDCA 83114 presentó mayor concentración con respecto al resto de las cepas de *L. plantarum* evaluadas, constituyéndose una buena candidata como biopreservante.

Una vez analizadas las condiciones de crecimiento de *L. plantarum* se continuó con el estudio de crecimiento y fermentación del gránulo CIDCA AGK1 en permeado de suero.

1.4 Capacidad de fermentación y producción de biomasa del gránulo CIDCA AGK1 en permeado de suero

1.4.1 Cinética de acidificación y concentración de ácidos orgánicos del permeado de suero fermentado con gránulos CIDCA AGK1

Los gránulos de kefir pueden fermentar, además de la leche, algunos productos derivados de la industria láctea y de origen vegetal (Gamba et al. 2016b; Liu et al. 2002; Londero et al. 2012; Rimada & Abraham 2001). El principal efecto de la fermentación es el descenso del pH debido a la producción de ácidos orgánicos, entre otros metabolitos (Garrote et al. 2001; Lopitz-Otsoa et al. 2006; Prado et al. 2015).

Se evaluó la capacidad del gránulo de kefir CIDCA AGK1 de acidificar el PS. Para ello se hicieron 12 subcultivos sucesivos de 24 horas cada uno inoculando el gránulo de kefir CIDCA AGK1 al 10% p/v en PS. Se evaluó el descenso de pH a la hora 24 de cada subcultivo. También se realizó el estudio de la cinética de acidificación midiendo el descenso del pH durante 24 horas en el subcultivo 1. En paralelo, se realizaron las mismas determinaciones con el gránulo CIDCA AGK1 inoculado al 10% p/v en leche UHT y los resultados obtenidos fueron empelados como parámetros de comparación.

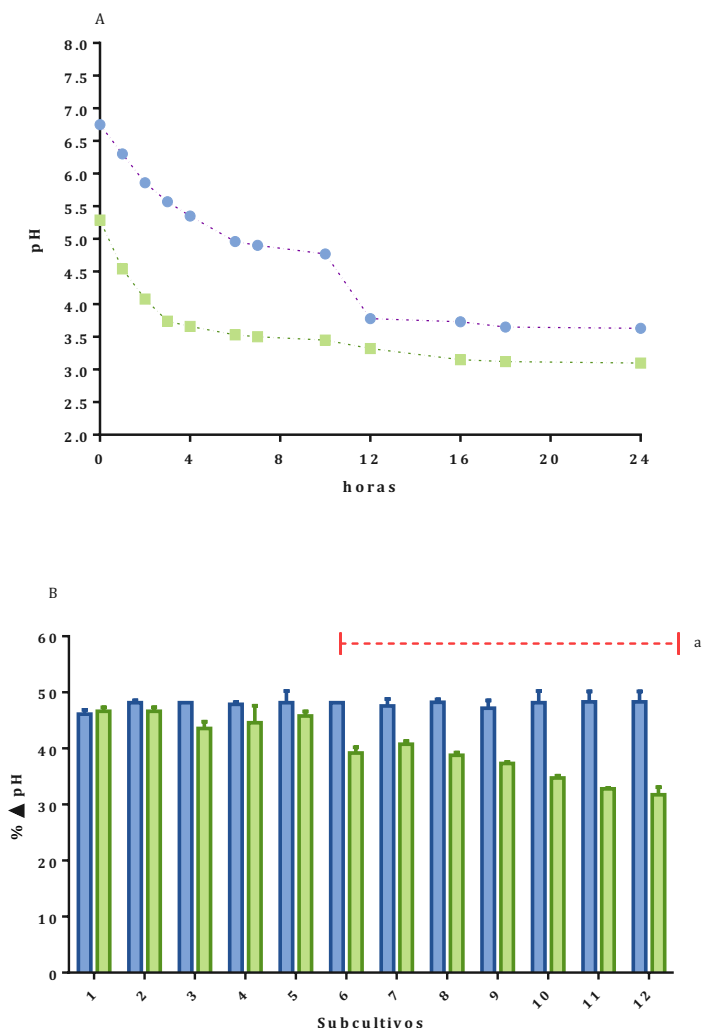


Figura 6: A) Cinética de pH de gránulo CIDCA AGK1 en: ● Leche, ■ PS². B) Descenso de pH durante 12 subcultivos de gránulo CIDCA AGK1 en: ■ Leche, ■ PS¹. Las barras corresponden a las DS a) a partir del día 6 hay diferencias significativas $\alpha < 0.05$. ANOVA.

¹Los gránulos CIDCA AGK1 se inocularon al 10% p/v en cada sustrato, incubando a 30°C durante 24 horas. Las mediciones de pH se hicieron cada 24 horas. ²Las mediciones de pH se hicieron cada 2 horas.

En la figura 6A se observa la cinética de descenso de pH de los gránulos CIDCA AGK1 en leche y en PS. El pH del PS descendió desde 5,5 hasta 3,3 luego de 24 horas de fermentación. El descenso de pH fue más acelerado en las primeras horas de incubación, hasta alrededor de la hora 4, a partir de la cual se hizo mucho menos pronunciado. Lo anterior permite inferir que durante este tiempo se produjeron ácidos orgánicos resultado del metabolismo de la lactosa presente en el PS reconstituido al 5% p/v. La leche inoculada con los gránulos de kefir tuvo, al igual que el PS, un descenso de pH más pronunciado durante las primeras 4 horas de fermentación. El pH inicial de 6,75 descendió hasta 3,5 al final del período analizado. La acidificación también se debió a la producción de ácidos orgánicos a

partir de la lactosa, cuya concentración en la leche es de 5,1% p/v (Sancor, 2018). De lo anterior se pudo determinar que los gránulos CIDCA AGK1, en el subcultivo 1, tienen la capacidad de fermentar el PS de manera similar a como fermentan la leche, generando un descenso del pH.

En concordancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo, Magalhães et al. (2011) determinaron que el pH de la leche fermentada con gránulos de kefir desciende abruptamente durante las primeras horas de fermentación y luego se estabiliza en valores próximos a 4. Con anterioridad se estudió la capacidad fermentativa del kefir y sus microorganismos aislados en otros productos lácteos como leche y suero de quesería. Leche inoculada al 10% p/v con gránulos de kefir CIDCA AGK1 incubada a 30°C durante 30 horas, alcanza un pH de 3,5 (Garrote et al. 2000). En otros estudios en los cuales se analizó la capacidad de fermentación del suero de quesería por gránulos de kefir inoculados al 10%, se alcanzaron pHs de alrededor de 3,8 luego de 24 horas de incubación a 20°C (Londero et al. 2014). Otro estudio que utilizó permeado de suero de otro origen comercial (ILOLAY) resuspendido al 5% p/v previamente esterilizado en el cual se inocularon gránulos de kefir CIDCA AGK1 al 10% alcanzó un pH 3,3-3,2 luego de un período de incubación de 48 horas (Gamba 2015). Tanto los resultados previos como los obtenidos en este estudio, demostraron la versatilidad del gránulo de kefir de leche para fermentar diferentes sustratos que contenían lactosa y la posibilidad de emplearlos para fermentar el PS.

Una vez realizada la cinética de pH al día 1, se procedió a medir el pH final de cada uno de los subcultivos durante 12 días (12 subcultivos), en los dos sustratos, leche y PS. Los datos obtenidos son los que se muestran en la figura 6B. A partir del subcultivo 6, hay diferencias significativas en el descenso de pH correspondiente a la fermentación de PS y leche. Dado que el PS es un sustrato que supone condiciones adversas para los gránulos de kefir es probable que cambien las poblaciones de microorganismos. Sin embargo durante los primeros días la capacidad de descender el pH se mantiene en ambos sustratos evaluados.

De modo semejante a lo realizado con los productos de fermentación de los lactobacilos aislados, se determinó la producción de ácidos láctico, acético, butírico y propiónico en el PS fermentado con gránulos de kefir CIDCA AGK1. A partir de las

determinaciones mediante HPLC, sólo se pudieron cuantificar los ácidos láctico y acético. Los resultados se presentan en la tabla 14.

Tabla 14: Concentración total de los ácidos orgánicos determinados en PS fermentado con gránulos de kefir CIDCA AGK1.

PS	pH	Ácido láctico (mM)	Ácido acético (mM)	Ácido propiónico (mM)
Fermentado con gránulo CIDCA AGK1	3,3	128,5 ± 18,3	42,7± 3,1	ND
Sin fermentar	5,5	4,2 ± 2,8	ND	ND

Ácidos orgánicos medidos por duplicado. PS fermentado obtenido en el primer subcultivo. ND: no detectado.

En el PS fermentado con gránulos CIDCA AGK1 se determinó una mayor concentración de ácido láctico que de ácido acético. La concentración de ácidos orgánicos determinada en PS fermentado con gránulos CIDCA AGK1 fue superior incluso a la leche fermentada con el gránulo CIDCA AGK1, que presenta un concentración de 92,5mM de ácido láctico y 4,3mM de ácido acético (Iraporda 2010). Esta diferencia puede deberse a la alta concentración de lactosa presente en el PS (70%) (Bruno 2016). El gránulo de kefir contiene bacterias ácido lácticas tanto homofermentativas como heterofermentativas, lo que explica la producción de ambos, ácido láctico y acético, durante la fermentación del PS. Las bacterias lácticas fermentan azúcares principalmente mediante dos rutas. La vía Embden-Meyerhof-Parnas que conduce casi exclusivamente a la producción de ácido láctico, conociéndose como fermentación homoláctica. Por otro lado, pueden utilizar la vía de las pentosas fosfato que conduce a la generación de cantidades significativas de otros productos finales tales como etanol, acetato y CO₂, además de ácido láctico. Esta última ruta es conocida como fermentación heteroláctica (Axelsson, 2004). Si bien estas vías son las más frecuentes, diferentes condiciones de crecimiento pueden afectar significativamente los productos finales formados por las bacterias lácticas fundamentalmente debido a que el piruvato sigue rutas metabólicas alternativas y/o al uso de aceptores externos de electrones. También

se ha determinado y cuantificado la presencia ambos ácidos en los productos de fermentación de otros sustratos por parte de gránulos de kefir. En suero de leche fermentado con gránulo de kefir CIDCA AGK10 durante 24 horas a 20°C se reportó una concentración de ácido láctico de 99 mM y de acético de 13,32 mM (Londero et al., 2012).

La presencia de ácido láctico y acético resultó importante ya que las formas no disociadas de los mismos son útiles como biopreservantes e inhibidores del crecimiento fúngico.

1.4.2 Cálculo de la concentración de ácidos orgánicos no disociados.

A partir de las concentraciones de ácidos orgánicos determinadas por HPLC, se calculó la concentración de ácidos no disociados en el PS fermentado con gránulos CIDCA AGK1 y los resultados se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15: Concentración de ácidos orgánicos no disociados en PS fermentado con gránulos CIDCA AGK1

Gránulo	pH	Ácido	%	Ácido	%
		Láctico ND (mM)	Ácido Láctico ND ¹	Acético ND (mM)	Ácido Acético ND ²
CIDCA AGK1	3,3 ± 0,04	97,1 ± 7,4	75,8 ± 0,9	40,9 ± 4,2	95,7 ± 0,1

¹Porcentaje del ácido láctico total que se encuentra en estado no disociado

²Porcentaje del ácido acético total que se encuentra en estado no disociado

Como se observó, anteriormente el producto de esta fermentación alcanza un pH más bajo que los correspondientes a los productos obtenidos con las cepas aisladas de *L. plantarum*. Esto se relacionó con mayor concentración de ácidos en el producto final. El ácido láctico fue el que se encontró en mayor concentración en el producto fermentado, seguido del ácido acético. Dado que el pH estuvo por debajo de los pKa de ambos ácidos, la concentración de ácidos ND fue alta, mayor al 75%, siendo esto un factor favorable en el análisis de las propiedades antimicrobianas y antifúngicas.

La mayor inhibición está directamente relacionada con el mayor contenido de ácidos orgánicos y con la mayor concentración de ácidos no disociados. Es

conocido que un ácido es más fuerte cuanto menor es su pKa, en este sentido, el ácido láctico (pKa 3,86) es más acidificante que el ácido acético (pKa 4,75). El ácido láctico es el principal producto metabólico producido por los microorganismos del gránulo de kefir. La inhibición del crecimiento microbiano se relaciona con la forma no disociada del ácido, dado que dicha forma es la que puede atravesar fácilmente la membrana celular de las bacterias y disociarse una vez dentro del citoplasma (Cherrington et al., 1990; Davidson, 2001). Este proceso conlleva a una disminución del pH intracelular que afecta la funcionalidad de las macromoléculas del citoplasma (Ricke 2003). De forma similar, el ácido acético interactúa con la membrana celular para neutralizar el gradiente electroquímico de protones, e incluso puede llegar a inhibir la captación de aminoácidos, disminuyendo la viabilidad fúngica. Se ha descrito que el efecto antifúngico del ácido acético a menudo es dependiente de la disminución del pH por parte del ácido láctico (Gould 1985).

1.4.3 Capacidad de incremento de la biomasa del gránulo CIDCA AGK1 en permeado de suero

Dado que el PS es una fuente limitada de nitrógeno, se estudió si los gránulos CIDCA AGK1 tenían la capacidad de formar biomasa al realizar varios subcultivos en dicho sustrato y estos resultados se compararon con la capacidad de generar biomasa en leche, una fuente rica de nitrógeno. Para ello se realizaron subcultivos sucesivos inoculando el gránulo al 10% p/v en el sustrato, cada 24 horas. Una vez terminado el periodo de incubación, se separó el gránulo del producto fermentado, se retiró la humedad de la superficie y se pesó, procediendo a ser reinoculado en el sustrato fresco, repitiéndose el proceso durante 10 días.

En la figura 7, se observa que los gránulos CIDCA AGK1 cultivados en leche tuvieron un incremento constante de la biomasa, con aumento de 7,8% en promedio en cada subcultivo. Otros investigadores han reportado que los gránulos de kefir cultivados en leche pueden duplicar su tamaño en una semana (Farnworth 2003; Lopitz-Otsoa et al. 2006).

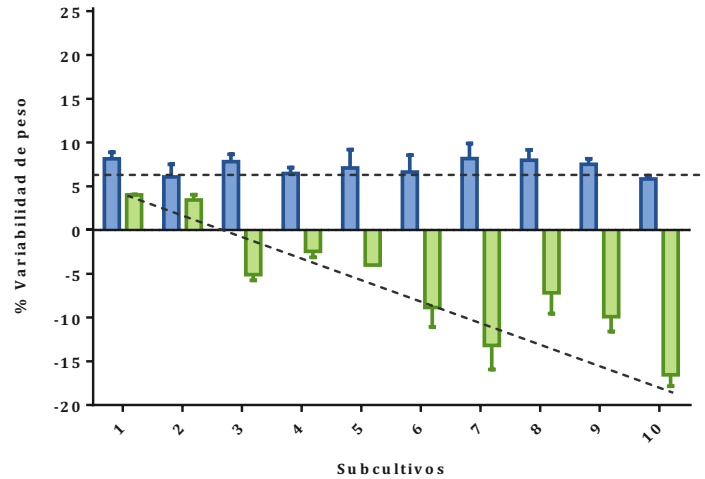


Figura 7: Análisis comparativo de la variación diaria del peso (expresada como % de cambio de biomasa) correspondiente al gránulo CIDCA AGK1 en leche (■) y PS (■) durante 10 días ^{1,2}.

¹Los gránulos CIDCA AGK1 se inocularon al 10% p/v en cada sustrato, incubando a 30°C durante 24 horas. Las mediciones de peso se hicieron cada 24 horas, y los gránulos se pesaron cada 24h y se reinocularon en sustrato fresco. Las barras corresponden a la desviación estándar.DS

²% de cambio en biomasa AGK1=[(Peso inicial-Peso final/Peso inicial)*100].

Los gránulos CIDCA AGK1 que fueron cultivados en PS presentaron un incremento de biomasa en los subcultivos de los días uno y dos. A partir del día tres, el cambio de biomasa entre cada subcultivo fue negativo, indicando que los microorganismos dejaron de producir biomasa y por el contrario se fue perdiendo matriz. Los resultados indicarían que los microorganismos involucrados en la síntesis de la matriz del gránulo, proteínas y polisacáridos, disminuyeron su concentración o que no podían producir dichos compuestos en PS. Estos resultados también podrían indicar que los microorganismos consumirían el propio polisacárido ante la ausencia de nutrientes. La pérdida de la capacidad de formar biomasa y de acidificar el sustrato con los sucesivos subcultivos, indican que ocurrieron cambios en las poblaciones microbianas y que se alteraron los procesos metabólicos normales de la población, a diferencia de la estabilidad observada a nivel fermentativo y de capacidad de crecimiento del gránulo cuando se empleó leche. Estos cambios tienen relación con los estudios realizados por Gamba et al. (2015b) en los cuales se observaron 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. Es probable que la desproteínización de los sueros sea un proceso cada vez más eficiente y como

consecuencia encontremos menor cantidad de compuestos nitrogenados en cada lote de PS deshidratado.

El incremento de biomasa en leche se atribuye a que las poblaciones presentes en el gránulo, interaccionando de manera simbiótica (Vedamuthu 1982; Witthuhn et al. 2005), sintetizan las proteínas y el polisacárido que componen la matriz (Garrote et al. 2010).

Algunas publicaciones han indicado que la fermentación a diferentes temperaturas en medios ricos en proteína, como el suero de leche, cambia la composición final del producto fermentado pero no disminuye la producción de biomasa (Londero 2012), indicando que para mantener dicha producción es fundamental el aporte de un medio rico en fuentes de nitrógeno que permitan al gránulo seguir creciendo. Lo contrario sucede con el PS, que al no poseer una cantidad significativa de aminoácidos o fuentes de nitrógeno estaría afectando la capacidad de los microorganismos de desarrollar y generar aumento de biomasa. El uso de gránulos de kefir para fermentar suero de quesería fue propuesto por primera vez por Rimada y Abraham (2001). Estos autores demostraron que los gránulos aumentaban su biomasa en suero desproteínizado, lo acidificaban, reducían su concentración de lactosa y liberaban polisacáridos al medio. Asimismo describieron que la producción de polisacáridos y el crecimiento de los gránulos en este sustrato eran afectados por la temperatura de fermentación. Las concentraciones de compuestos nitrogenados encontradas por los autores mencionados después de la desproteínización estuvieron entre 3,19 - 2,74 g/l, muy superiores a la presente en el PS utilizado en este trabajo. Por lo tanto no es comparable como producto similar.

En esta investigación, el gránulo de kefir pudo fermentar el PS, pero dado que fue incapaz de incrementar su biomasa se decidió trabajar con gránulos conservados y mantenidos en leche, y utilizarlos para fermentar el PS durante 24 horas. Los estudios previos del grupo han sugerido el uso del PS solo como un medio de cultivo temporal, mientras los gránulos sean conservados y repicados en leche (Gamba 2015).

La figura 8 muestra las fotografías correspondientes a los días 1, 5 y 10 del gránulo repicado sucesivamente en PS.

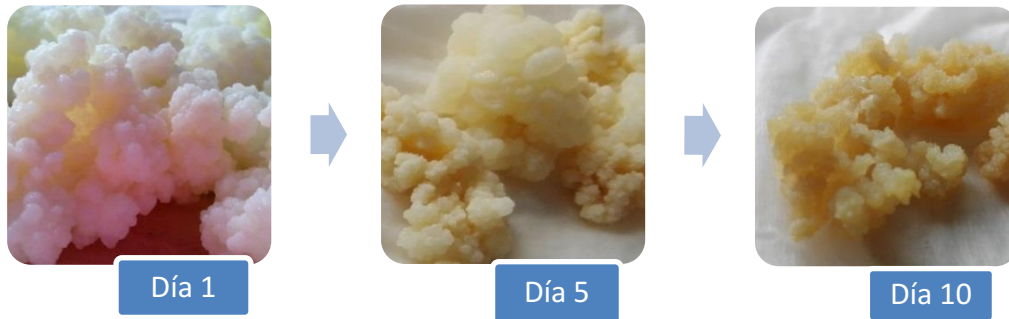


Figura 8: Fotografías que permiten observar el cambio de forma y color de los gránulos CIDCA AGK1 inoculados en PS los días 1, 5 y 10 durante la realización de sucesivos subcultivos en este medio.

Los gránulos cambiaron su consistencia y color mostrando un deterioro. Se pueden describir como gránulos menos compactos, con pérdida de color (de blanco brillante a marrón opaco) y consistencia menos compacta. En la figura 8 correspondiente al día 1 se puede ver el gránulo en su condición ideal que ha sido descrita por algunos autores: de 1-3 cm de tamaño, lobulados, de forma irregular de textura viscosa pero firme (Kosikowski & Mistry, 1997; La Rivière & Kooiman 1967). Para mantener estas características los gránulos se transfieren diariamente a leche fresca y se les permite crecer por aproximadamente 20 horas; tiempo durante el cual los gránulos aumentan su masa en un 25% (Halle' et al., 1994). El deterioro del gránulo se observa en los cambios de forma y textura apreciados en la figura 8 fotografías correspondientes a los días 5 y 10.

Una de las razones de los cambios en el gránulo puede ser el cambio en la microbiota del mismo. La población microbiana que compone los gránulos de kefir parece ser relativamente constante a lo largo del tiempo. Para determinar el cambio microbiológico que sucede se analizó la composición microbiana que desprende el gránulo al producto fermentado. La comparación se realizó en los subcultivos 2, 4, 6 y 10 y los resultados se presentan en la figura 9.

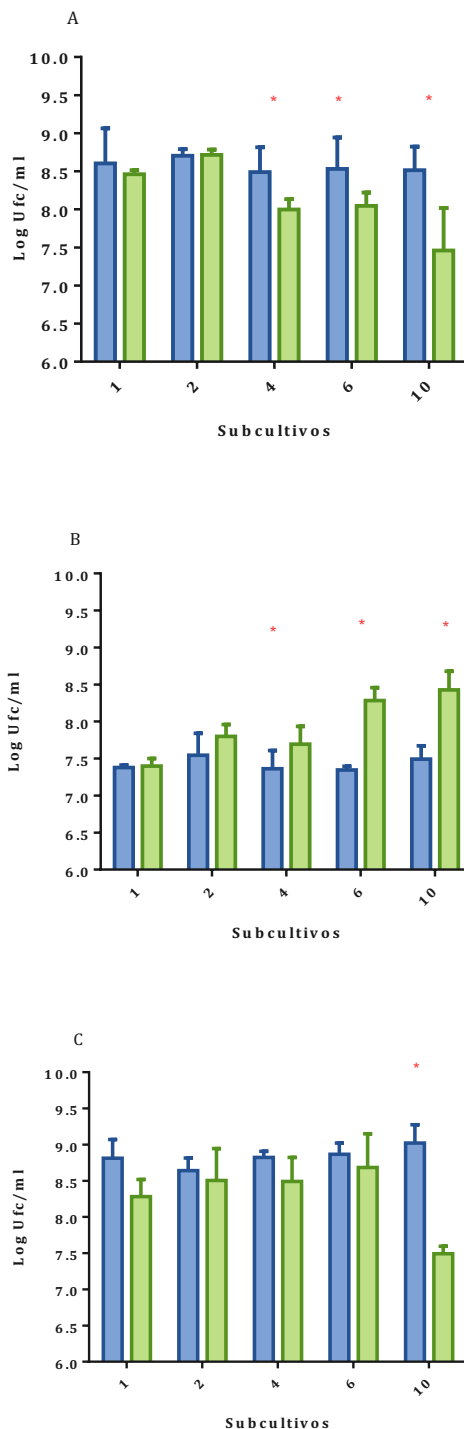


Figura 9: Recuento de microorganismos viables en leche fermentada con gránulos CIDCA AGK1 y Permeado de suero fermentado con gránulos CIDCA AGK1 A) Bacterias ácido lácticas B) levaduras C) Bacterias ácido acéticas. Las barras corresponden a la desviación estándar (DS). * Representa el subcultivo donde hubo diferencias significativas entre los tratamientos. ANOVA $\alpha < 0.05$. Análisis de medias por comparación múltiple.

La composición microbiológica se analizó mediante recuento de microorganismos viables en placa. En la figura 9A, 9B, y 9C, se observan los cambios en la composición de los microorganismos a medida que los gránulos

fueron subcultivados sucesivamente en permeado de suero o en leche. Durante los subcultivos 1 y 2 el PS presenta una composición microbiológica semejante al kefir obtenido en leche. El contenido de bacterias ácido lácticas en suero fermentado con gránulos de kefir fue significativamente menor y el de levaduras significativamente mayor ($P < 0,05$) que los correspondientes obtenidos en leche fermentada a partir del subcultivo 4. Al día 10 se observó una disminución significativa en las bacterias ácido acéticas ($P < 0,05$). En la figura se observa que en los subcultivos 1 y 2 los recuentos en ambos medios resultaron semejantes para las tres comunidades evaluadas, este comportamiento se correlaciona con estudios previos realizados en el grupo donde se adaptaron gránulos CIDCA AGK1 a PS con subcultivos sucesivos, encontrando que el producto fermentado con gránulos adaptados durante 12 semanas, tenían una concentración de bacterias ácido lácticas diez veces menor y de levaduras por encima del mínimo establecido en el Código Alimentario Argentino (Gamba, 2015; CAA, 2010). Magalhães et al. (2010) evaluaron la estabilidad de la comunidad microbiana de los gránulos de kefir al cambiar de leche a suero como sustrato y determinaron que no había variaciones en la estructura interna del gránulo ni en los perfiles de DGGE de bacterias y levaduras. Las bacterias ácido lácticas son microorganismos exigentes respecto a los requerimientos nutricionales, precisando medios ricos para su crecimiento. El nitrógeno podría actuar como nutriente limitante del crecimiento, ya que se ha descrito que el crecimiento de dichas bacterias no ocurre sin la adición de fuentes externas de nitrógeno debido al medio insuficiente (Burns et al. 2008). Debe considerarse que, además de los microorganismos que son liberados al medio, aquellos microorganismos que componen los gránulos permanecen activos metabólicamente, de manera que es esperable que los nutrientes se agoten durante la fermentación del PS, dando como resultado un cambio en los grupos microbianos por exclusión competitiva (Apar et al. 2017). Ese descenso de los recuentos de bacterias ácido lácticas puede afectar las bacterias que están directamente asociadas con la producción del exopolisacárido que constituye la matriz del gránulo de kefir el cual pierde la capacidad de aumentar su biomasa en el mismo período.

Conclusiones

- ❖ Las cepas de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, CIDCA 8316, CIDCA 8329, CIDCA 8346 crecieron hasta alcanzar concentraciones del orden de 10^9 UFC/ml cuando se cultivaron en MRS-PS, siendo la condición (2) la más eficiente de cultivo.
- ❖ Ninguna de las cepas de *L. plantarum* evaluadas creció significativamente en el permeado de suero sin suplementar, condición (3).
- ❖ El pH del permeado de suero se redujo significativamente (descenso de 5,2 a 3,5) como consecuencia de la fermentación en la condición MRS-PS (2) con las cepas de *L. plantarum* de este estudio. Se determinaron en dicho producto metabolitos como ácidos orgánicos (acético, láctico y propiónico) con elevadas concentraciones de las formas no disociadas, que son los componentes antimicrobianos más importantes producidos por las bacterias lácticas. La incubación de las cepas de *L. plantarum* sin suplementar produjo ácido láctico, acético y propiónico en menor concentración, en la condición (2)
- ❖ El gránulo de kefir CIDCA AGK1, tiene capacidad para fermentar el permeado de suero, mostrando que tiene capacidad de descender el pH.
- ❖ El gránulo de kefir CIDCA AGK1 pierde la capacidad de crecer en PS a partir del subcultivo 4.
- ❖ Durante los primeros 4 subcultivos de la fermentación del permeado de suero por el gránulo de kefir CIDCA AGK1, se producen diferentes metabolitos, principalmente ácidos orgánicos (acético, láctico) y el pH disminuye, generando altas concentraciones de ácidos orgánicos no disociados.

Capítulo II

Potencial antifúngico del permeado de suero fermentado con *L. plantarum* y gránulos de kefir CIDCA AGK1

Introducción

La contaminación fúngica es uno de los principales problemas que afectan la producción avícola a nivel mundial. Se estima que entre el 5 y el 10% de la producción mundial de alimentos se pierde debido al deterioro por los hongos (Pitt & Hocking 2009). Si bien la principal fuente de contaminación animal es a partir del alimento balanceado, los hongos están en el aire en forma de esporas, en el suelo o camas y el agua de bebida (Skóra et al. 2016). La producción animal puede presentar serios problemas tanto para los trabajadores, como para la salud animal y el medio ambiente circundante. La producción avícola intensiva implica grandes densidades de animales en áreas pequeñas, esto confiere una fuente importante de contaminación del aire que puede constituir un riesgo considerable para la salud de los pollos y los operarios (DeBey et al. 1995; Lugauskas et al. 2004; Sauter et al. 1981).

En general en el aire, predominan los géneros *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* y las levaduras (Araujo & Cabral 2010). La microbiota en el aire interior de los ambientes de cría de pollos a menudo contiene mohos de los géneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis* y *Trichophyton* (Lugauskas et al. 2004). Las formas viables de estos hongos y sus metabolitos (micotoxinas) pueden causar trastornos en la cría de aves y en los operarios, afectando principalmente el tracto respiratorio (irritación de la membrana mucosa, micosis invasiva de pulmones, rinitis alérgica, alveolitis pulmonar, asma) y la piel (dermatomicosis y onicomicosis) (Cafarchia et al. 2014; Munir et al. 2017; Saleemi et al. 2010).

Otra importante fuente de contaminación fúngica son los alimentos para animales, los cuales se diferencian entre simples y balanceados. Los simples están constituidos por un solo componente mientras que los balanceados se obtienen por la mezcla de varios alimentos simples. Un alimento simple como el maíz es rico en carbohidratos pero pobre en proteínas, minerales y algunas vitaminas. Para compensar la deficiencia en nutrientes, debe mezclarse con otros alimentos como harina de carne, harina de soja, girasol, hueso y conchilla que aportan calcio, nitrógeno y fósforo, obteniéndose un alimento balanceado (Barroeta et al. 2011). A partir de alimentos para animales se han aislado con frecuencia hongos de los

géneros *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Cunninghamella* spp., *Cladosporium* spp., *Phoma* spp., *Endomyces* spp. y *Eurotium* spp (Bueno 2003). Otra consecuencia de la contaminación fúngica en el alimento es la presencia de micotoxinas. Las más importantes en aves son las aflatoxinas, ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZEA), fumonisinas, citrinina y los tricotecenos deoxinivalenol (DON o vomitoxina) y toxina T-2 (Dalcero et al. 1997; Fraga et al. 2007; Skóra et al. 2016; Śliżewska & Piotrowska 2014) . Sin embargo, los pollos son los animales de granja más sensibles a los efectos tóxicos de aflatoxinas, incluso a pequeñas cantidades (Shuaib et al. 2010) y a pesar de que los pollos generalmente no alcanzan a desarrollar cáncer debido a su corto tiempo de vida, desarrollan otro tipo de trastornos relacionados con la intoxicación por AFB₁, que afectan negativamente a su salud (Galarza-Seeber et al. 2016). Dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición, AFB₁ puede causar anorexia con baja tasa de crecimiento, menor utilización del alimento, disminución de la producción de huevos y aumento de la mortalidad (Akande et al. 2006) concomitante con el paso de AFB₁ al producto final obtenido. Por todo esto el saneamiento, la prevención y la descontaminación juegan un papel importante en el proceso productivo como estrategias para la eliminación de la carga microbiana (Arroyo-Manzanares et al. 2014; Blajman et al. 2014; Dalié et al. 2010).

El género *Aspergillus* es uno de los más ampliamente distribuidos en el mundo, hasta el momento se conocen 339 especies (Perrone & Gallo 2017). Pitt y Hocking (2009) describen que dentro de los grupos de hongos de mayor riesgo se encuentra *Aspergillus*, especialmente *Aspergillus fumigatus*, ya que es un patógeno para el humano causando aspergilosis invasiva en pulmones y respuestas alérgicas. Esta especie también es responsable de daños en plantas y productos obtenidos de éstas y se le conoce como un hongo oportunista en el almacenamiento de granos.

La contaminación por *Aspergillus* en ambientes de cría de pollos genera la presencia de micotoxinas, como las aflatoxinas, ochratoxina A y aunque menos extendida las fumonisinas (Pitt & Hocking 2009). Las aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ son unas de las micotoxinas más tóxicas y carcinogénicas. La exposición humana a las aflatoxinas ocurre inicialmente en la cadena alimentaria, particularmente en los

cereales y las oleaginosas, el café, vino, frutas y frutos secos, generando consecuencias para la salud humana (Urrego Novoa & Díaz 2015). Otra vía de ingesta de micotoxinas tiene lugar por consumo de productos de origen animal, que hayan estado en contacto con materiales y/o alimentos contaminados por hongos toxigénicos (Bondy & Pestka 2000). Sin embargo, existe también el riesgo profesional de contaminación por inhalación de conidios en el aire o en materiales fácilmente volátiles dentro de lugares de trabajo donde haya riesgo de exposición (Munir et al. 2017). La aparición de estos hongos en el ambiente de cría de aves, genera un problema de contaminación tanto para las aves de consumo como para los operarios del galpón.

Es importante resaltar que si bien los hongos son ubicuos y su prevención es una de las tareas más difíciles de abarcar en el área de cría de pollos, encontrar hongos altamente contaminantes y toxigénicos genera la necesidad de encontrar alternativas de prevención, ya sean químicas o biológicas. El uso de microorganismos para la descontaminación fúngica en alimentos y ambientes ofrece una buena alternativa. En los últimos años se ha propuesto trabajar especialmente con bacterias ácido lácticas (BAL) que tanto ellas como sus productos fermentados pueden contribuir a la inhibición del desarrollo de mohos y disminuir la producción de micotoxinas (Kachouri et al. 2014; Londero et al. 2014; Lutful Kabir 2009; Yaman et al. 2006).

Es bien sabido que el efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos es causado por la fracción no disociada del ácido. La porción no disociada de ácido débil, cuando está presente en el estado no cargado, tiene una mayor capacidad para penetrar las células fúngica que los productos de disociación (Giannuzzi et al. 1999). Otros autores también han descrito la capacidad de *L. plantarum* de producir compuestos fungicidas y han sugerido su aplicación para aumentar la vida útil de productos panificados (Dal Bello et al. 2007; Gamba et al. 2016b; Gerez et al. 2013; Lavermicocca et al. 2000; León Peláez et al. 2012) y para biopreservar vegetales frescos (Sathe et al. 2007).

Por otra parte, los estudios realizados sobre secuestro de aflatoxinas se han enfocado en la captura de éstas bajo diferentes condiciones *in vitro* e *in vivo* y en

disminuir la absorción intestinal a nivel del tracto gastrointestinal de animales y humanos (Ahlberg et al. 2015; El-Nezami et al. 2000; Gratz 2007; Haskard et al. 2001; Pierides et al. 2000) Para esto se han utilizado Bacterias Ácido Lácticas (BAL) con capacidad de disminuir la adherencia de patógenos y toxinas bacterianas en líneas celulares (Gamba et al. 2015b; Londero et al. 2015; Schnürer & Magnusson 2005; Sjögren et al. 2003). También se ha demostrado que diferentes bacterias probióticas, en especial lactobacilos tienen la capacidad de unirse eficientemente a AFB₁ *in vitro* (Ahlberg et al. 2015; El-Nezami et al. 1998; Gratz et al. 2004).

A partir de todo lo anterior, es evidente la necesidad de un estricto control de la calidad micológica de los alimentos y el ambiente general de la cría de pollos parrilleros. En esta investigación se trabajó con la fracción microbiana del kefir (FMK) y con *Lactobacillus plantarum* aislados de gránulos de kefir y el PS fermentado con éstos, como potenciales biocontroles. Los hongos empleados en este estudio se aislaron dentro de un proyecto en común (PICT 2011-0716) UNLP-INTA, por personal científico del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA EEA), Laboratorio de Sanidad Aviar-Concepción del Uruguay, en la zona de producción aviar. Estos hongos fueron desafiados con productos fermentados con los microorganismos seleccionados en el capítulo 1 y con gránulos de kefir CIDCA AGK1. Adicionalmente se evaluó la capacidad de los microorganismos del kefir y de los lactobacilos aislados de disminuir el daño celular causado por aflatoxina AFB₁ y de secuestrar dicha micotoxina *in vitro*.

Objetivos

- ❖ Identificar a nivel molecular los hongos filamentosos aislados del ambiente de cría de pollos.
- ❖ Estudiar el efecto antifúngico de las cepas de *L. plantarum* contra los hongos identificados.
- ❖ Estudiar el efecto antifúngico del sobrenadante libre de células de los permeados de suero fermentados con *L. plantarum* y el gránulo de kefir CIDCA AGK1.
- ❖ Analizar el efecto protector de las cepas de *L. plantarum* y la fracción microbiana del kefir (FMK) frente a la citotoxicidad de Aflatoxina B₁ en la línea celular HepG2.
- ❖ Determinar la capacidad de captura de la Aflatoxina B₁ de las cepas de *L. plantarum* y de la FMK.

Resultados y discusión

1. Selección de hongos e identificación a nivel molecular por secuenciación

En el INTA se aisló un total de 38 hongos, en diferentes granjas de producción aviar de la provincia de Entre Ríos, Argentina, siendo éstos: 2 hongos aislados del aire de las nacedoras, 4 de alimento, 23 de agua de bebedero, 2 de cama y 7 de pulmón de pollo. Los hongos fueron cultivados en agar DRBC (Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol, Oxoid, Hampshire, UK) e identificados morfológicamente como pertenecientes al género *Aspergillus*. Una vez fueron recibidos en la UNLP, se procedió a su selección e identificación. Se seleccionaron 6 hongos para los estudios de inhibición fúngica, con la intención de cubrir los diferentes ambientes de contacto de las aves, en diferentes tiempos de crianza, los cuales se presentan en la Tabla 1 y en la figura 1.

Tabla 1: *Aspergillus* spp seleccionados y origen de aislamiento.

Nombre	Origen
I-3: G0074(3)	Aire sala nacedoras
I-4: G0074(24)	Aire sala nacedoras
I-5: 3-1(2)INV0205	Alimento
I-6: 3A- 2(4)INV0205	Alimento
I-12:HCU 21/14	Agua
I-37: HCU 46/14	Cama

En la figura 1 se observan las fotos de la observación microscópica de los *Aspergillus* spp seleccionados

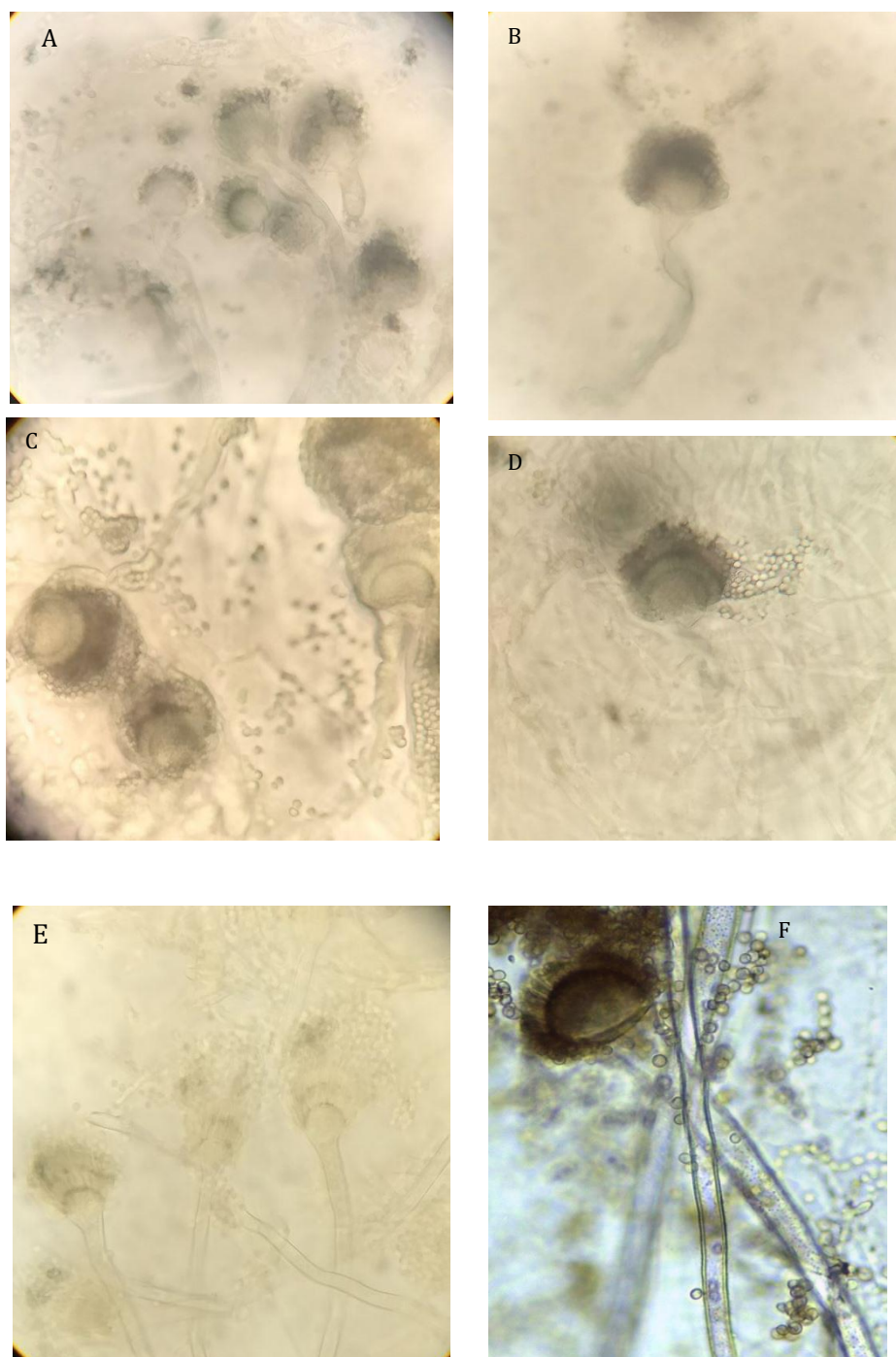


Figura 1: Observación microscópica de los *Aspergillus* sp seleccionados **A)** I-3: G0074(3); **B)** I-4: G0074(24); **C)** I-12:HCU 21/14 **D)** I-37: HCU 46/14; **E)** I-6 3A- 2(4)INV0205; **F)** I-5: 3-1(2)INV0205

Los hongos seleccionados fueron cultivados en caldo YES y a partir del micelio obtenido se extrajo el ADN total. A partir del ADN se amplificó la región ITS1-ITS2 mediante una reacción de PCR (Garmendia & Vero 2016). Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar y a partir de estos resultados se realizó una comparación con secuencias depositadas en diferentes bases de datos para la identificación de los hongos.

Para la identificación molecular de aislados de *Aspergillus* a nivel de especie, se considera como un criterio importante una primera identificación fenotípica del aislado, para continuar con la secuenciación de la región ITS y de los genes de la β -tubulina o calmodulina (Balajee et al. 2009). En este estudio se realizaron ampliaciones y secuenciaciones de la región ITS1-5.8SrADN-ITS2.

La amplificación de la zona ITS1-5.8SrADN-ITS2 se hizo a partir de *primers* universales diseñados a partir de las zonas que codifican para el ARN ribosomal y por lo tanto altamente conservadas. Los *primers* se denominan ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCCGCTTATTGATATGC). Los hongos fueron identificados mediante la comparación de las secuencias obtenidas (Macrogen®, Korea) con bases de datos depositadas en NCBI utilizando BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Garmendia & Vero 2016). Los resultados se muestran a continuación en la tabla 2.

Tabla 2: Identificación molecular de hongos aislados de producción aviar.

Identificación Interna	Hongos identificado	Cepa tipo	% similitud ^a	Fuente
I-3: G0074(3)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	NRRL 163	100%	(Peterson 2008)
I-4: G0074(24)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	NRRL 163	100%	(Peterson 2008)
I- 5: 3-1(2)INV0205	<i>Aspergillus minisclerotigenes</i>	CBS 117635	100%	(Carvajal-Campos et al. 2017)
I-6: 3A- 2(4)INV0205	<i>Aspergillus terreus</i>	ATCC 1012	99%	(Haugland et al. 2004)
I-12:HCU 21/14	<i>Aspergillus fumigatus</i>	NRRL 163	99%	(Peterson 2008)
I-37: HCU 46/14	<i>Aspergillus fumigatus</i>	NRRL 163	100%	(Peterson 2008)

^a Los resultados del BLAST se encuentran en el anexo 2

La tabla 2 muestra los *Aspergillus* identificados de los cuales cuatro son *A. fumigatus*, uno *A. minisclerotigenes* y uno *A. terreus*. Todos los *A. fumigatus* y *A. minisclerotigenes* tuvieron una similitud del 100% y *A. terreus* tuvo una similitud del 99% con las cepas tipo depositadas en las bases de datos. En la identificación molecular realizada se aseguró que los hongos fueran correctamente identificados con base en el principio de que dos hongos cuyas secuencias ITS1-ITS2 coinciden en un 98,5%, pertenecen a la misma especie según *International Society of Human and Animal Mycology* (ISHAM) (Irinnyi et al. 2015). La identificación correcta de hongos en un ambiente conocido es esencial para muchos fines biológicos, como la evaluación de la biodiversidad, taxonomía y conservación de especies (Frézal & Leblois 2008) y es necesaria para establecer las técnicas de control de estas especies.

Los análisis evolutivos fueron realizados con el software MEGA 6.0 (Tamura et al. 2013) y la historia evolutiva se infirió usando el método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987). El árbol consenso por bootstrap se infirió a partir de 1000 réplicas y se basó en el análisis de las secuencias de la región ITS1-ITS2 del rDNA. El porcentaje de réplicas en las cuales se asociaron los taxones en un cluster (bootstrap 1000 réplicas) se muestran al lado de las ramificaciones (Felsenstein, 1985). El árbol filogenético se trazó a escala, y la longitud de las ramas se trazó en las mismas unidades que las distancias evolutivas usadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se computaron usando el método de Jukes-Cantor (Jukes & Cantor 1969) y las unidades correspondieron al número de sustituciones de bases nitrogenadas por sitio. El análisis incluyó 11 secuencias

nucleotídicas. Todas las posiciones conteniendo *gaps* y datos faltantes fueron eliminadas. Hubo un total de 476 posiciones en el conjunto final de datos.

En la figura 2 se presenta el árbol filogenético de los hongos identificados a nivel molecular.

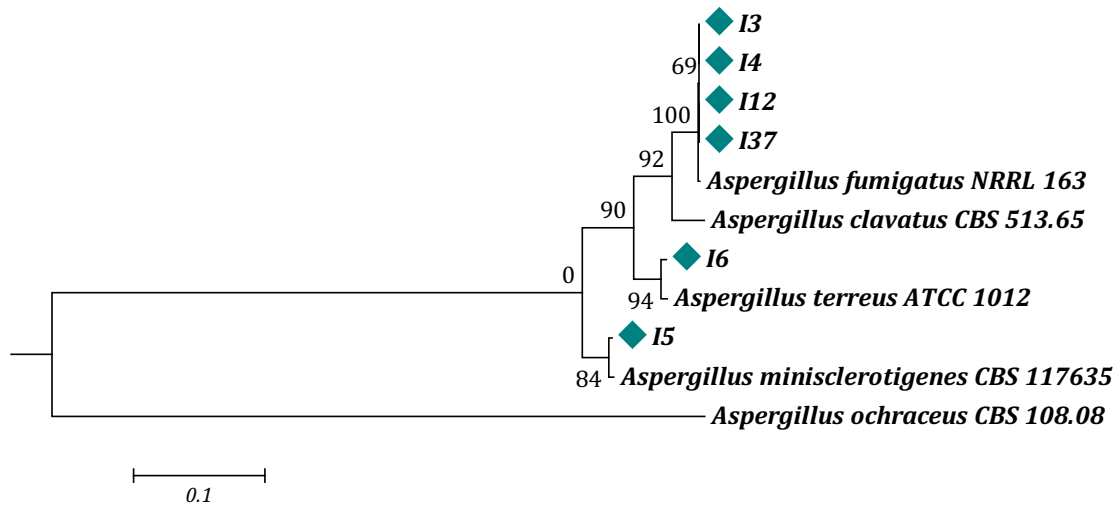


Figura 2: Árbol filogenético de *Aspergillus* identificados a nivel molecular. La historia evolutiva se infirió usando el método de Neighbor-Joining

A partir de la identificación de los hongos seleccionados se agregó la especie y género a la identificación interna tal como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3: Identificación final de Hongos aislados de producción aviar

Codificación Inicial	Nueva identificación interna	Procedencia
I- 3: G0074(3)	<i>Aspergillus fumigatus</i> I3	Aire sala nacedoras
I- 4: G0074(24)	<i>Aspergillus fumigatus</i> I4	Aire sala nacedoras
I- 5: 3-1(2)INV0205	<i>Aspergillus minisclerotigenes</i> I5	Alimento
I-6: 3A- 2(4)INV0205	<i>Aspergillus terreus</i> I6	Alimento
I-12:HCU 21/14	<i>Aspergillus fumigatus</i> I12	Agua
I-37: HCU 46/14	<i>Aspergillus fumigatus</i> I37	Cama

A partir de la identificación molecular, se puede determinar las características específicas que pueden presentar los hongos seleccionados desde el punto de vista de contaminación de ambientes, operarios y producto final. La presencia de *Aspergillus* es una de las principales causas de la degradación de los productos agrícolas, ya que pueden contaminar los alimentos en diferentes etapas del procesamiento y la manipulación (Varga et al. 2004) . Además, principalmente las especies de *A. niger*, *A. flavus* y *A. fumigatus* son causantes de enfermedades animales y humanas, micotoxicosis e infecciones invasivas en pacientes inmunocomprometidos y reacciones de hipersensibilidad (p. Ej., asma, alveolitis alérgica) en individuos expuestos (Jørgensen 2007; Sharma 1993; van Veen et al. 1999).

La presencia de *A. fumigatus* en aire y cama, implica un algo riesgo para la salud humana y animal (Lovett 1972; Viegas et al. 2012; Williams et al. 2004). Se sabe que la infección por *Aspergillus fumigatus* ocurre en una amplia variedad de especies aviares, siendo el sistema respiratorio el más afectado causando neumonía (Latgé 2001; Munir et al. 2017); además de otras afecciones descritas tempranamente como son dermatitis oftalmitis y encefalitis (Arné et al. 2011; Dagenais & Keller 2009). *A. fumigatus* secreta varias enzimas como proteasas y metabolitos secundarios tóxicos entre estos la gliotoxina, la cual es una micotoxina inmunosupresora (Schlam et al. 2016).

Aspergillus minisclerotigenes constituye un riesgo ya que se ha reportado su capacidad de producir aflatoxinas que además de tener una alto potencial hepatotóxico y cancerígeno, puede causar la muerte o la reducción de la productividad en aves de corral (Sheikh-Ali et al. 2014). *Aspergillus minisclerotigenes* además es capaz de producir otras micotoxinas como el ácido ciclopiazónico (CPA) el cual se ha relacionado, junto con las aflatoxinas, en la enfermedad X de los pavos (*Turkey "X" disease*) (Bradburn et al. 1994). También se ha reportado la producción de micotoxinas de menor importancia, algunas de las cuales tienen propiedades antibióticas y otras han sido clasificadas como compuestos tóxicos (Pildain et al., 2008) tales como ácido aspergílico, parasiticólido que son compuestos tóxicos para ácaros y bacterias (Perry et al. 1984) y el ácido kójico que si bien se usó por años en la industria cosmética hoy se sabe que tiene un efecto citotóxico y mutagénico (Saghaie et al. 2013; Singh et al. 2016; Wei et al. 1991).

Aspergillus terreus produce un amplio rango de metabolitos que se consideran micotoxinas, que incluyen citreoviridina (Samson et al. 2011), patulina citrinina, emodina, terretonina, geodina, territrem, gliotoxina y citocalasina (Balajee 2009). Pero de estos solo territrem parecen tener toxicidad significativa, las cuales son toxinas tremorgénicas (Ling 1994; Samson et al. 2011). Esta toxina, que en dosis de 1 mg por peso de ratón, aumentó la tasa de respiración, temblores sostenidos en todo el cuerpo, seguido por la disminución de la fuerza de las extremidades, salivación, incontinencia y convulsión. Al aumentar la dosis de la toxina a 2 mg los animales murieron (Ling 1994). *Aspergillus terreus* también es un patógeno humano importante, y a menudo causa infección diseminada con mayor letalidad en comparación con otros *Aspergillus* spp. (Abarca 2000; Balajee 2009; Samson et al. 2011; Zohri et al. 2017). Algunos estudios indican que los condios producidos por *A. terreus* pueden inducir respuestas inflamatorias elevadas en un modelo pulmonar de aspergilosis (Deak et al. 2011). *Aspergillus terreus* es responsable aproximadamente del 10% de los casos de aspergilosis pulmonar humana, y además de una amplia gama de afecciones, incluyendo infecciones cutáneas y oftálmicas. Los perros pastor alemán parecen ser particularmente

susceptibles a las infecciones por *A. terreus* (Berry & Leisewitz 1996; Elad et al. 2008).

Por lo anterior se evidencia el riesgo tan alto que implica la contaminación de hongos en la producción avícola, tanto para los pollos, el producto final, como el operario. Por lo tanto es importante encontrar alternativas de biocontrol para disminuir la propagación y crecimiento de los hongos contaminantes.

2. Capacidad antifúngica de *Lactobacillus plantarum* y los sobrenadantes libres de células de PS fermentado con *Lactobacillus plantarum* y el gránulo CIDCA AGK1

Se estudió la capacidad antifúngica de las cepas de *Lactobacillus plantarum* y, los sobrenadantes libres de células de PS fermentado con *L. plantarum* y el gránulo CIDCA AGK1 contra los hongos seleccionados e identificados, aislados de lugares de producción aviar. Para ello se realizaron tres tipos de ensayos como fueron inhibición fúngica por sobrecapa, reducción de la germinación, reducción de la pendiente de crecimiento y aumento de la fase de latencia (Caro Velez & León Peláez 2015; Gamba et al. 2016b; Guimarães et al., 2018, , León Peláez et al. 2012; Onilude et al., 2005).

2.1 Inhibición fúngica por *L. plantarum* mediante técnica de sobrecapa

Se estudió la capacidad antifúngica de las cuatro cepas de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, 8316, 8346 y 8329, contra los seis *Aspergillus* seleccionados, empleando el método de sobrecapa (Guimarães et al., 2018; Onilude et al 2005). Mediante este ensayo se hizo un *screening* de la inhibición fúngica obtenida cuando se tiene una mezcla de la bacteria crecida en medio sólido y de sus metabolitos difundidos alrededor de la colonia. El ensayo se llevó a cabo por triplicado para cada cepa de *Lactobacillus plantarum* contra cada uno de los aislamientos de *Aspergillus*. Las placas se incubaron en aerobiosis a 30 ° C durante cinco días y se examinaron los halos de inhibición alrededor de las líneas de crecimiento bacteriano. Las zonas claras de inhibición se clasificaron de la siguiente manera: Negativo (-), cuando tuvo lugar el crecimiento fúngico sin presencia de halo de inhibición; signo positivo (+) cuando se generó un halo de inhibición fúngica menor a 5 mm y doble signo positivo (++) cuando el halo de

inhibición fúngica fue mayor a 5 mm. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 4.

Tabla 4: Capacidad antifúngica de *Lactobacillus plantarum* contra *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus* y *A. minisclerotigenes*, determinada por técnica de sobrecapa.

<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>A. fumigatus</i> I3	<i>A. fumigatus</i> I4	<i>A. fumigatus</i> I12	<i>A. fumigatus</i> I37	<i>A. minisclerotigenes</i> I5	<i>A. terreus</i> I6
CIDCA 83114	+	-	+	-	-	+
CIDCA 8316	+	+	+	+	-	-
CIDCA 8329	++	+	-	-	+	-
CIDCA 8346	+	++	+	++	-	+

Las zonas clara de inhibición se clasificaron de la siguiente manera: Negativo (-) No hay inhibición, Signo positivo (+) zona de inhibición menor a 5mm, y doble signo (++) zona de inhibición mayor a 5mm.

Todos los lactobacilos evaluados generaron un halo de inhibición en el crecimiento fúngico. *L. plantarum* CIDCA 83114 generó halos de inhibición en el crecimiento de tres aislados, *A. fumigatus* I3, *A. terreus* I6, y *A. fumigatus* I12. *L. plantarum* CIDCA 8316 generó halos de inhibición en el crecimiento de los cuatro aislados de *A. fumigatus* I3, I4, I12 e I37, pero no sobre las demás especies. *L. plantarum* CIDCA 8329 generó un halo de inhibición fuerte (>5mm) para *A. fumigatus* I3, y halo de inhibición menor a 5mm para *A. fumigatus* I4 y *A. minisclerotigenes* I5, siendo el único lactobacilo con efecto antifúngico contra este último aislado fúngico. *L. plantarum* CIDCA 8346 generó un halo de inhibición fuerte contra *A. fumigatus* I4 e I37 y un halo menor a 5mm con *A. fumigatus* I3, I12 y *A. terreus* I6.

Se pudo determinar que los aislados de *A. fumigatus* fueron los más sensibles a la inhibición por sobrecapa, siendo el de mayor inhibición I3, seguido de I4, I12 e I37. Los aislados más resistentes fueron *A. terreus* y *A. minisclerotigenes*, el cual sólo fue inhibido por *L. plantarum* CIDCA 8329.

El lactobacilo con mayor capacidad inhibitoria fue *L. plantarum* CIDCA 8346, seguido de *L. plantarum* CIDCA 8329 y 8316, mientras que la menor inhibición se alcanzó con *L. plantarum* 83114.

En la figura 3 se observan algunos resultados de inhibición fúngica por sobrecapa

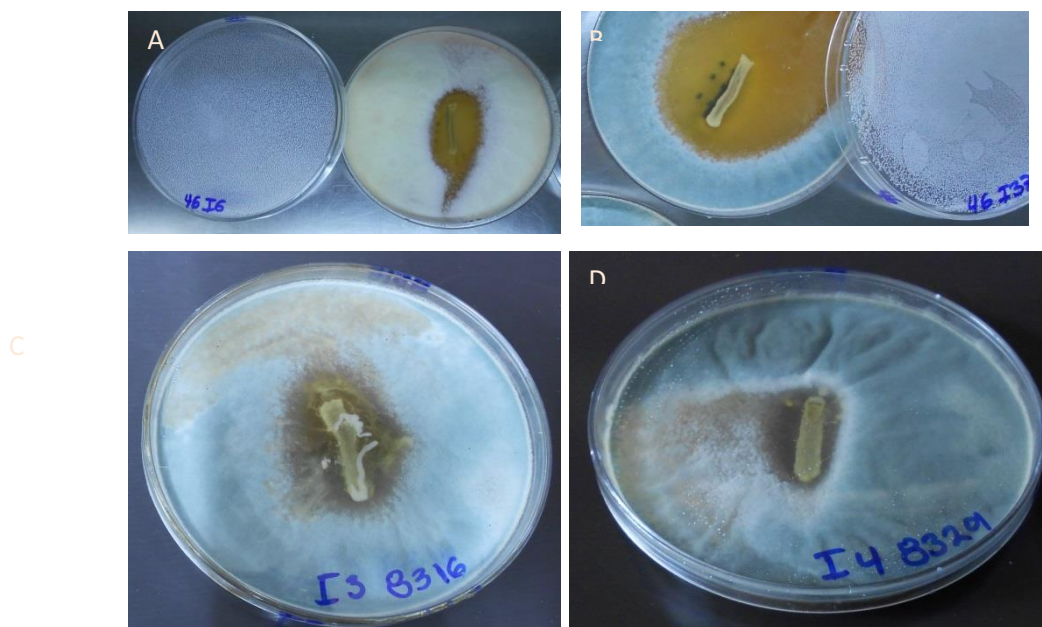


Figura 3: Inhibición fúngica por técnica de sobrecapa. A) *A. fumigatus* I4 sobre *L. plantarum* CIDCA 8346 (++) B) *A. fumigatus* I37 sobre *L. plantarum* CIDCA 8346 (++) C) *A. fumigatus* I3 sobre *L. plantarum* CIDCA 8316 (+) D) *A. fumigatus* I4 sobre *L. plantarum* CIDCA 8329 (+)

La figura 3 muestra un halo claro en los desafíos donde hubo inhibición por el método de sobrecapa, las figuras 3A y 3D muestran que *L. plantarum* CIDCA 8346 generó un halo de inhibición fuerte sobre *A. fumigatus* I4 y una inhibición positiva sobre *A. terreus* I6. En la figura 3B se observa que hay una inhibición < 5mm con *L. plantarum* CIDCA 8346 enfrentado a *A. fumigatus* I37. En la figura 3C se observa la inhibición que tiene en el crecimiento de *A. fumigatus* I3 frente a *L. plantarum* CIDCA 8316.

De acuerdo a los resultados obtenidos con la técnica de sobrecapa, a fin de lograr la inhibición fúngica de los hongos estudiados, se deben emplear las cepas *L. plantarum* CIDCA 8329 y 8346.

Onilude et al (2005) estudiaron mediante la técnica de sobrecapa, el efecto antifúngico de *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis* y *Lactococcus spp.* sobre hongos aflatoxigénicos. *L. plantarum* YO tuvo capacidad de inhibir (++) *A. flavus* M1, *A.*

parasiticus C2, *A. flavus* B4, *A. flavus* B5, *A. flavus* C6 y *A. parasiticus* AF7 (Onilude et al. 2005). El anterior, entre otros resultados, les permitió concluir que el uso de una suspensión de BAL entre ellas *L. plantarum* y *L. casei* tenía capacidad inhibitoria para el crecimiento de *Aspergillus* spp. Los resultados acá presentados permitieron demostrar que *L. plantarum* tiene acción antifúngica y que específicamente, *L. plantarum* CIDCA 8329 demostró capacidad antifúngica ante el hongo con mayor resistencia a la inhibición, como *Aspergillus minisclerotigenes* I5.

Otros estudios recientes sobre la actividad antifúngica de 50 cepas de BAL aisladas de leche, incluidos los géneros *Oenococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*, mediante la técnica de sobrecapa encontraron que, 31 BAL no mostraron actividad antifúngica, mientras que dentro de las cepas que si mostraron actividad antifúngica, cinco de ellas tenían una clara inhibición sobre *A. flavus* MUM. No obstante, el único aislado que logró causar una inhibición fuerte sobre el hongo fue *L. plantarum* UM55, aislada de leche (Guimarães et al. 2018) esto sugiere que *Lactobacillus plantarum* es una BAL con un alto potencial antifúngico.

Los resultados hasta acá obtenidos demuestran que en la interacción entre bacteria hongo tiene lugar un efecto antifúngico. Sin embargo, dado que la inhibición varía según el hongo y cada cepa de *Lactobacillus plantarum*, se puede considerar que dicha inhibición es cepa dependiente.

2.2 Porcentaje de la reducción de la germinación fúngica (%RG) en presencia de sobrenadantes libres de células obtenidos por fermentación de PS con *L. plantarum* o gránulo CIDCA AGK1

Una vez demostrado que la actividad antifúngica tenía lugar en presencia de *L. plantarum* y sus metabolitos, se procedió a evaluar la capacidad antifúngica del producto fermentado en ausencia de bacterias. Para ello se obtuvieron los sobrenadantes libres de células (SLC), mediante filtración en esterilidad del producto fermentado con cada microorganismo. En este caso se evaluaron los SLC provenientes tanto de los productos fermentados con las cepas seleccionadas como los provenientes del PS fermentado con gránulos de kefir CIDCA AGK1. La obtención y características de los SLC se describieron en el capítulo 1 inciso 1.2 y 1.3.

En la figura 4 se observa la DO_{580} del crecimiento fúngico en presencia de cada SLC. El control positivo corresponde a los conidios inoculados en SLC del PS sin fermentar.

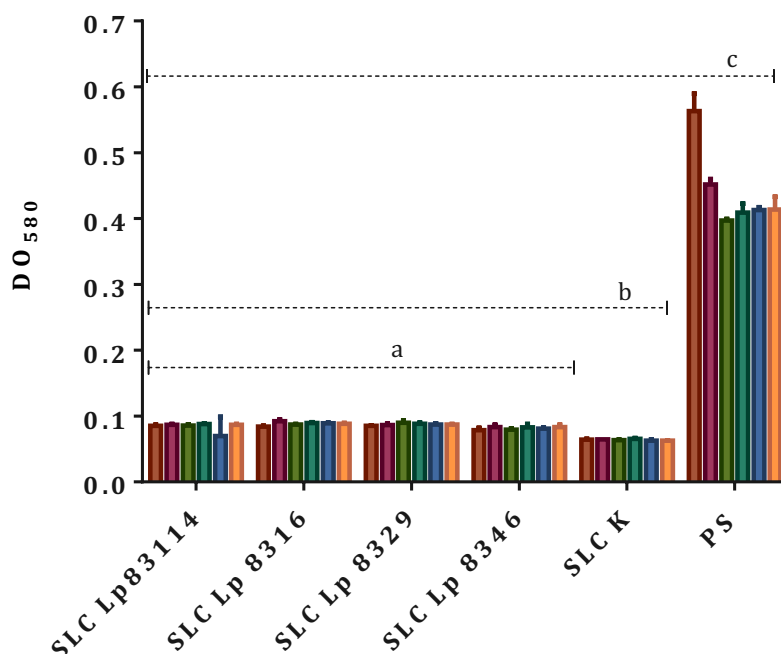


Figura 4: Crecimiento fúngico (DO) en presencia de SLC obtenidos por fermentación de PS con *L. plantarum* y gránulo CIDCA AGK1. : ■ *Aspergillus fumigatus* I3; ■ *Aspergillus fumigatus* I4; ■ *Aspergillus fumigatus* I12; ■ *Aspergillus fumigatus* I37; ■ *Aspergillus terreus* I6; ■ *Aspergillus minisclerotigenes* I5.^{a, b, c}: Letras diferentes simbolizan diferencias significativas $\alpha < 0,05$ ANOVA. Seguido de Test de comparación múltiple (T.student). SLCLp: Sobrenadante libre de células obtenido por la fermentación de PS con *L. plantarum*. SLCK: Sobrenadante libre de células obtenido por la fermentación de Permeado de suero con gránulos de kefir CIDCA AGK1. PS: Sobrenadante libre de células de Permeado de suero sin fermentar.

Los ensayos de Reducción de Germinación se realizaron con los SLC de PS fermentado con *L. plantarum* según el tratamiento (2) (MRS-PS), que había sido seleccionado en el capítulo 1. En este ensayo, los conidios de cada hongo se coincubaron con el SLC durante 48h a 30°C en placas de microdilución y una vez terminado este período se leyó la DO_{580} . En la figura 4 se observan las lecturas de DO_{580} de cada hongo estudiado al final de la incubación con los SLC obtenidos con *L. plantarum*, gránulos CIDCA AGK1 y con PS sin fermentar. Se obtuvo un crecimiento significativamente superior de todos los hongos en presencia del SLC del PS sin fermentar donde no se había detectado presencia de ácido acético ni propiónico y una concentración muy baja de ácido láctico (4,2 mM, Tabla 14 capítulo 1). Por el contrario, el crecimiento fúngico disminuyó al estar en contacto

con los metabolitos producidos durante la fermentación. Adicionalmente, el SLC proveniente del producto fermentado con gránulo de kefir redujo significativamente el crecimiento fúngico con respecto al obtenido con *L. plantarum*, indicando que éste posee por su composición, una mayor capacidad inhibitoria.

A partir de los resultados del crecimiento fúngico medidos como DO, se calculó el porcentaje de reducción de la germinación, empleando una fórmula que compara la DO del tratamiento, correspondiente a la inhibición, con la DO del control positivo, correspondiente al crecimiento máximo del hongo.

$$\%RG = [(DO_{cp} - DO_{tto}) / DO_{cp}] * 100 \text{ (Gerez et al. 2009)}$$

Donde

DO_{cp} : DO_{580} control positivo

DO_{tto} : DO_{580} de tratamiento

Los %RG calculados en cada tratamiento se promediaron y se presentan en la figura 5.

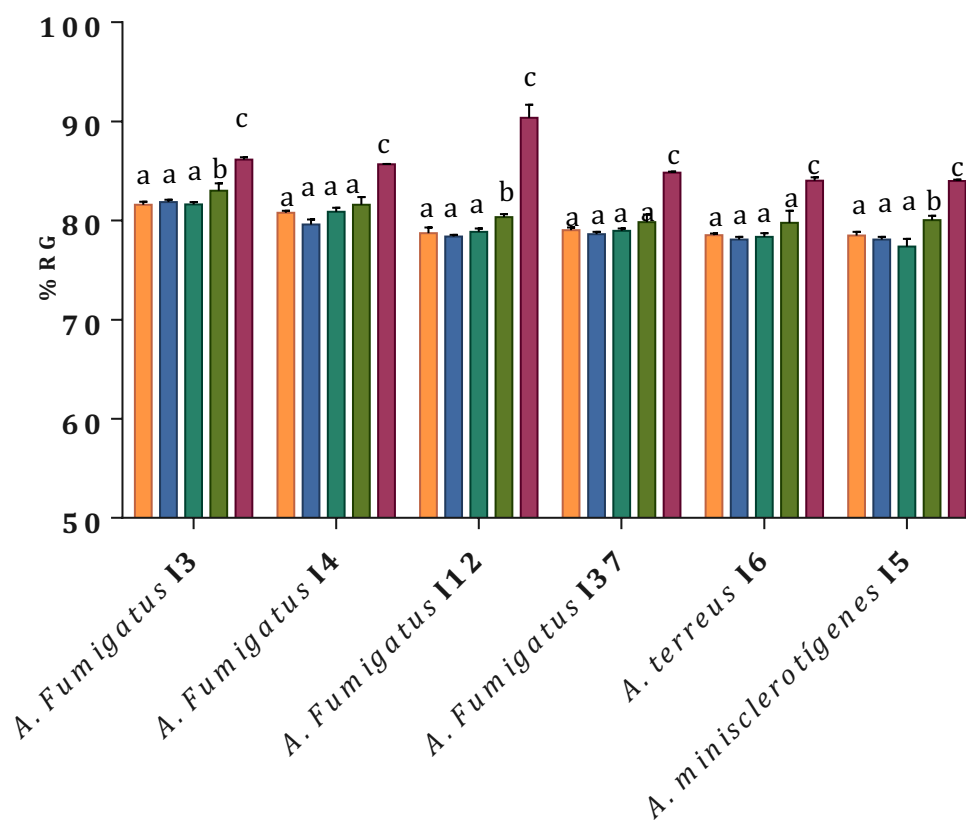


Figura 5: Porcentaje de reducción de la germinación (%RG) en presencia de SLC obtenidos por fermentación de PS con *L. plantarum* y gránulo CIDCA AGK1. : ■ SLC de PS de *L. plantarum* CIDCA 83114; ■ SLC de PS de *L. plantarum* CIDCA 8316; ■ SLC de PS de *L. plantarum* CIDCA 8326; ■ SLC de PS de *L. plantarum* CIDCA 8346; ■ SLC de PS de granulo CIDCA AGK1 ^{a, b, c} Letras diferentes simbolizan diferencias significativas $\alpha < 0,05$ ANOVA. Seguido de Test de comparación múltiple

Se observó que todos los valores de %RG fueron superiores al 70% indicando una capacidad inhibitoria fuerte de los metabolitos producidos por todos los microorganismos evaluados. Los SLC obtenidos con las cepas de *L. plantarum* generaron un porcentaje de RG cercanos al 80% mostrando una actividad antifúngica 10% superior a la fuerte. Adicionalmente, el SLC de *L. plantarum* CIDCA 8346 presentó diferencias significativas con respecto al %RG de los otros tres *L. plantarum*, frente a *A. fumigatus* I3, I12 y *A. minisclerotígenes* I5.

Los conidios en presencia del SLC obtenido con gránulos de kefir CIDCA AGK1 sufrieron mayor inhibición que en presencia de los obtenidos con *L. plantarum*.

Los SLC del PS fermentado con el granulo CIDCA AGK1 tuvieron la mayor capacidad inhibitoria frente a todos los hongos, por lo cual se deduce que la microbiota del gránulo puede sintetizar un complejo de sustancias antifúngicas en el permeado de suero con mayor efecto que aquellas producidas por cepas individuales de *L. plantarum*.

Por otra parte al presentar un pH menor en sustrato indicaría que el %RG está fuertemente relacionado con el descenso de pH y la presencia de ácidos orgánicos ya descritos en el capítulo 1, donde se comprobó que el PSF con gránulos CIDCA AGK1 presentaba una concentración superior de ácidos láctico y acético (128,5 y 42,7 mM respectivamente). Estos resultados coinciden con estudios realizados sobre inhibición fúngica con SLC de diferentes sustratos fermentados con gránulo CIDCA AGK1 donde tuvo lugar una inhibición fuerte de *Aspergillus flavus*, *Penicillium sumatrense*, y *Fusarium graminearum* (Gamba 2015). En otro estudio Leon-Pelaez (2013) encontró que el PSF con gránulos CIDCA AGK1 causaba un %RG superior al 90% para *A. flavus* AFUNL5, *A. parasiticus* NRRL 2999, *P. sumatrense* CMUNLP3, *P. crustosum* CMUNLP4, y *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* CMUNLP6. *T. longibrachiatum* CMUNLP5, *F. graminearum* FG44, *A. terreus* y *A. fumigatus* tuvieron un %RG de 83, 87, 75 y 83% respectivamente.

Varios estudios ratifican que la presencia de ácidos en estado no disociado son los responsables de la acción antifúngica de los SLC de diferentes lactobacilos. Además otra de las características importante es que el pH sea bajo en los SLC, ya que, si bien la presencia de ácido orgánicos es importante, la mayor actividad antifúngica la presentan los ácido orgánicos no disociados, ya que son estos los que pasan a través de la membrana de las células fúngicas y reducen el pH intracelular y esto ocasiona una disminución de la actividad metabólica (Gamba et al. 2016b; Guimarães et al. 2018). Estudios realizados con los SLC PSFG (permeado de suero fermentado con gránulos CIDCA AGK1) a pH 3,5 y 4, con altas concentraciones de ácidos no disociados, con concentraciones de 109 mM de ácido láctico ND y 47,4 mM para ácido acético, produjeron una inhibición fuerte (>70%), mientras que los

mismo SLC alcalinizados hasta pH 4,5, con la menor concentración de ácidos no disociados, 8,2 y 18,8 mM para ácido láctico ND y ácido acético ND respectivamente, produjeron una inhibición entre débil y moderada (Gamba et al. 2015b), lo cual refuerza que a mayor disociación de los ácidos presentes, mayor es el efecto antifúngico.

Por otra parte, todos los *L. plantarum* generaron un %RG alto sobre los hongos evaluados, lo cual puede asociarse a la presencia de ácidos orgánicos producidos por cada microorganismo. *L. plantarum* CIDCA 8346 produjo la mayor concentración de ácido láctico (35,3 mM) en el SLC, seguido de *L. plantarum* CIDCA 8329 (33,7mM). *L. plantarum* CIDCA 83114 y 8316 produjeron concentraciones de 31-32 mM de ácido láctico.

En estudios realizados para identificar la naturaleza de la actividad antifúngica de *L. plantarum* UM55 se hicieron diferentes tratamientos sobre el SLC tales como tratamientos térmicos, tratamiento con proteasas, y neutralización del pH. Se observó que los SLC de *L. plantarum* UM55 mantuvieron sus propiedades inhibitorias contra el crecimiento fúngico y la producción de aflatoxinas después de los tratamientos con calor y con proteasas; mientras que los SLC que se sometieron a la neutralización del pH perdieron su actividad antifúngica. Su efecto inhibitor sobre el crecimiento fúngico se redujo completamente (Guimarães et al. 2018). Gerez et al. (2009) informaron un efecto similar para otras cepas *L. plantarum*, habiendo observado que la modificación del pH en los SLC redujo severamente la actividad antifúngica. Por lo tanto, es concluyente que el efecto antifúngico de los ácidos orgánicos producidos en los PS fermentados con *L. plantarum* y el gránulo CIDCA AGK1, está activo siempre y cuando se mantengan en pH cercanos o por debajo del pKa de los ácidos presentes, para mantener un mayor porcentaje de disociación y que estos cumplan con la función antifúngica. Gamba (2015) analizó el efecto inhibitorio obtenido con suero acidificado artificialmente con ácido láctico y acético, indicado que estos ácidos están en gran medida implicados en el efecto antifúngico del suero fermentado con gránulos de kefir. El ácido acético es efectivo en la prevención del crecimiento de numerosos hongos filamentosos mientras que el ácido láctico tiene un efecto antifúngico limitado (Araujo & Rodrigues 2004; Gerez et al. 2013; León Peláez et al. 2012;

Pundir & Jain, 2010). Se ha descrito que la concentración inhibitoria mínima de ácido láctico es aproximadamente 10 veces superior a la de acético para hongos filamentosos (Gerez et al. 2009; León Peláez et al. 2012). Sin embargo, se ha demostrado que estos dos ácidos presentan efecto sinérgico, potenciándose su actividad antifúngica cuando se encuentran combinados (Fernandez et al. 2017; León Peláez et al. 2012).

A fin de profundizar el estudio de la capacidad antifúngica de los productos fermentados con BAL y gránulo de kefir CIDCA AGK1, se realizaron experimentos donde se puede observar y cuantificar la modificación del tiempo de latencia y la velocidad de crecimiento de los hongos en un medio sólido adicionado con los SLC obtenidos. Los resultados se muestran a continuación.

2.3 Reducción del tiempo de latencia (Lag) y la velocidad de crecimiento (K_D) fúngica en presencia de sobrenadantes libres de células obtenidos por fermentación de PS con *L. plantarum* y gránulo CIDCA AGK1

Para determinar la tasa crecimiento y la fase de latencia de los hongos, se reemplazó el 70% del agua del medio de cultivo, con los diferentes PSF. Como control se usó el medio adicionado con PS estéril al 70% v/v y se determinaron los parámetros cinéticos.

2.3.1 Determinación de las pendientes de crecimiento

Para determinar el control positivo de crecimiento en placa de los hongos filamentosos, se evaluó si existía diferencia en los parámetros de crecimiento K_D y Lag en dos medios diferentes. Los medios de cultivo utilizados fueron medio MEA sólo y el otro en medio MEA con el sobrenadante estéril del PS sin fermentar, a fin de determinar si la sola presencia de los compuestos del PS ejercía un efecto en el crecimiento fúngico. Los datos fueron graficados como se muestra en la figura 6.

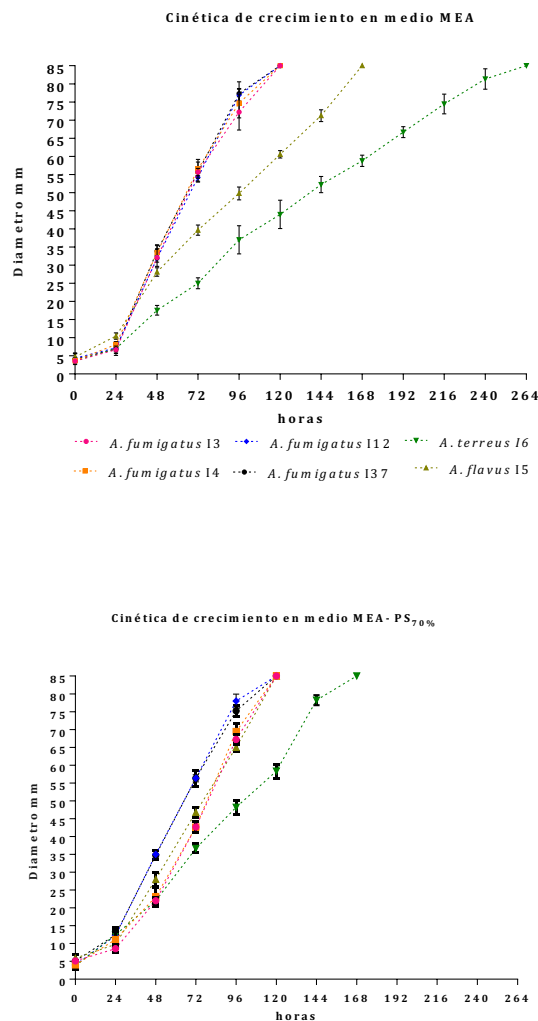


Figura 6: Cinéticas de crecimiento de *A. fumigatus*, *A. minisclerotigenes* y *A. terreus* en dos medios de cultivo. A) Medio MEA, medida del crecimiento diametral del hongo cada 24 horas ● *Aspergillus fumigatus* 13; ■ *Aspergillus fumigatus* 14; ◆ *Aspergillus fumigatus* 112; ● *Aspergillus fumigatus* 137; ▼ *Aspergillus terreus* 16; ▲ *Aspergillus minisclerotigenes* 15 B) Medio MEA -PS_{70%} medida del crecimiento diametral del hongo cada 24 horas ● *Aspergillus fumigatus* 13; ■ *Aspergillus fumigatus* 14; ◆ *Aspergillus fumigatus* 112; ● *Aspergillus fumigatus* 137; ▼ *Aspergillus terreus* 16; ▲ *Aspergillus minisclerotigenes* 15

Se observan las cinéticas de crecimiento de los hongos en dos medios MEA (5A) y MEA-PS_{70%}(5B). Estos medios se utilizaron como controles para determinar el efecto del permeado de suero sobre el crecimiento fúngico. En la figura 6A, donde se registran los datos del crecimiento de los hongos en MEA, se puede ver que las cepas de *A. fumigatus* 13, 14, 112 e 137, tuvieron en este medio un crecimiento muy similar entre sí, y crecieron de manera más acelerada que *A.*

minisclerotigenes I5 y *A. terreus* I6. *A. terreus* I6 fue el hongo que más tiempo tardó alcanzando el crecimiento máximo en la placa de MEA, aproximadamente 264 h.

Los datos que se muestran en la figura 6B corresponden a las cinéticas de crecimientos de los hongos en medio MEA-PS_{70%}. En la figura se puede observar que los hongos alcanzaron el crecimiento máximo en menor tiempo que en el caso del crecimiento en MEA (5A). *Aspergillus fumigatus* I3, I4, I12 e I37 presentaron curvas más pronunciadas una vez superado el tiempo de latencia. *Aspergillus minisclerotigenes* I5 alcanzó el crecimiento máximo en un tiempo menor al presentado en MEA. *Aspergillus terreus* I6 es el hongo que más tarda en crecer, no obstante la presencia de PS en el medio aceleró su crecimiento máximo en placa. Se puede inferir que el PS agregado al medio de cultivo afecta las condiciones de crecimiento fúngico, por lo cual debe ser incluido en el control positivo. A partir de los gráficos se pudieron obtener los datos de velocidad de crecimiento K_D (mm/h) y el tiempo de latencia (Lag) de los hongos en los medios MEA y MEA-PS_{70%}, los datos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Velocidad de crecimiento K_D (mm/h) y tiempo de latencia (Lag) de los hongos en medio MEA y medio MEA-PS_{70%}

HONGO	Lag (h)		K_D (mm/h)	
	MEA	MEA-PS _{70%}	MEA	MEA-PS _{70%}
<i>Aspergillus fumigatus</i> I3	15,5 ± 0,6 ^a	19,6 ± 0,9 ^b	0,82 ± 0,02 ^A	0,93 ± 0,06 ^B
<i>Aspergillus fumigatus</i> I4	13,5 ± 1,4 ^a	17,5 ± 0,8 ^b	0,81 ± 0,02 ^A	0,91 ± 0,09 ^B
<i>Aspergillus fumigatus</i> I12	15,7 ± 0,4 ^a	16,4 ± 1,2 ^b	0,84 ± 0,04 ^A	0,89 ± 0,01 ^B
<i>Aspergillus fumigatus</i> I37	14,6 ± 1,4 ^a	15,1 ± 0,8 ^b	0,83 ± 0,04 ^A	0,97 ± 0,08 ^B
<i>Aspergillus terreus</i> I6	7,4 ± 1,8 ^a	16,3 ± 1,7 ^b	0,34 ± 0,07 ^A	0,44 ± 0,02 ^B
<i>Aspergillus minisclerotigenes</i> I5	4,0 ± 0,8 ^a	17,2 ± 2,1 ^b	0,49 ± 0,06 ^A	0,77 ± 0,08 ^B

^{a, b}, letras minúsculas simbolizan diferencias significativas $\alpha < 0,05$ ANOVA. Seguimiento de Test de comparación múltiple en el tiempo de latencia. ^{A, B}. Letras diferentes simbolizan diferencias significativas $\alpha < 0,05$ ANOVA. Seguimiento de Test de comparación múltiple

En medio MEA, *Aspergillus fumigatus* I3, I4, I12 e I37 presentaron velocidades de crecimiento en un promedio de 0,82 mm/h y un tiempo de latencia de 15 h, sin embargo estos parámetros cambiaron cuando fueron crecidos en

medio MEA-PS_{70%}. La presencia de PS en MEA, aceleró el crecimiento de los hongos, estos presentaron un aumento en la velocidad de crecimiento entre de entre 0,05-0,10mm/h más que en el caso del crecimiento en MEA. Todos los hongos experimentaron un aumentos en el latencia en el medio MEA-PS_{70%}, *A. fumigatus* I12 e I37 no aumentaron significativamente el tiempo de latencia. *A. terreus* I6 también aumentó el tiempo de latencia y presentó mayor velocidad de crecimiento, presentando un aumento 0,18 mm/h de más que en medio MEA. *A. minisclerotigenes* I5 presentó el mismo comportamiento descrito para los hongos. Tuvo, un aumento del tiempo de latencia, incluso mayor a 10 h, pero una vez superado este tiempo su velocidad de crecimiento fue mayor, encontrándose un aumento de 0,29 mm/h más que en medio MEA.

Se encontró que los hongos en presencia de PS aumentaron la velocidad de crecimiento, aun incluso cuando la fase Lag es mayor en algunos casos, una vez que superan esta etapa los hongos alcanza la mayor superficie de la placa en menor tiempo que en el crecimiento en MEA. Por lo tanto para realizar el análisis de la fase de latencia y el porcentaje de disminución de la K_D , se tomó como control las características cinéticas de los hongos en MEA-PS_{70%}.

En estudios de las mismas características Gamba (2013) encontró que la presencia de PS en el medio de cultivo MEA-PS_{70%} no presentó diferencias significativas en el crecimiento de *F. graminearum*. Sin embargo, en el mismo ensayo al probar el medio con *A. parasiticus* CMUNLP7, tuvo un aumento significativo en la velocidad de crecimiento y un aumento en la fase de latencia, concluyendo que la adición de PS 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.

Para determinar la inhibición fúngica en placa con medio MEA suplementado se realizaron ensayos con el medio suplementado con los SLC de los PS fermentados con las cepas de *L. plantarum* y con el gránulo CIDCA AGK1. En las figuras 6 y 7 se observan las curvas de crecimiento de los hongos crecidos en medios MEA adicionado con SLC_{70%} (MEA-SLC_{70%})

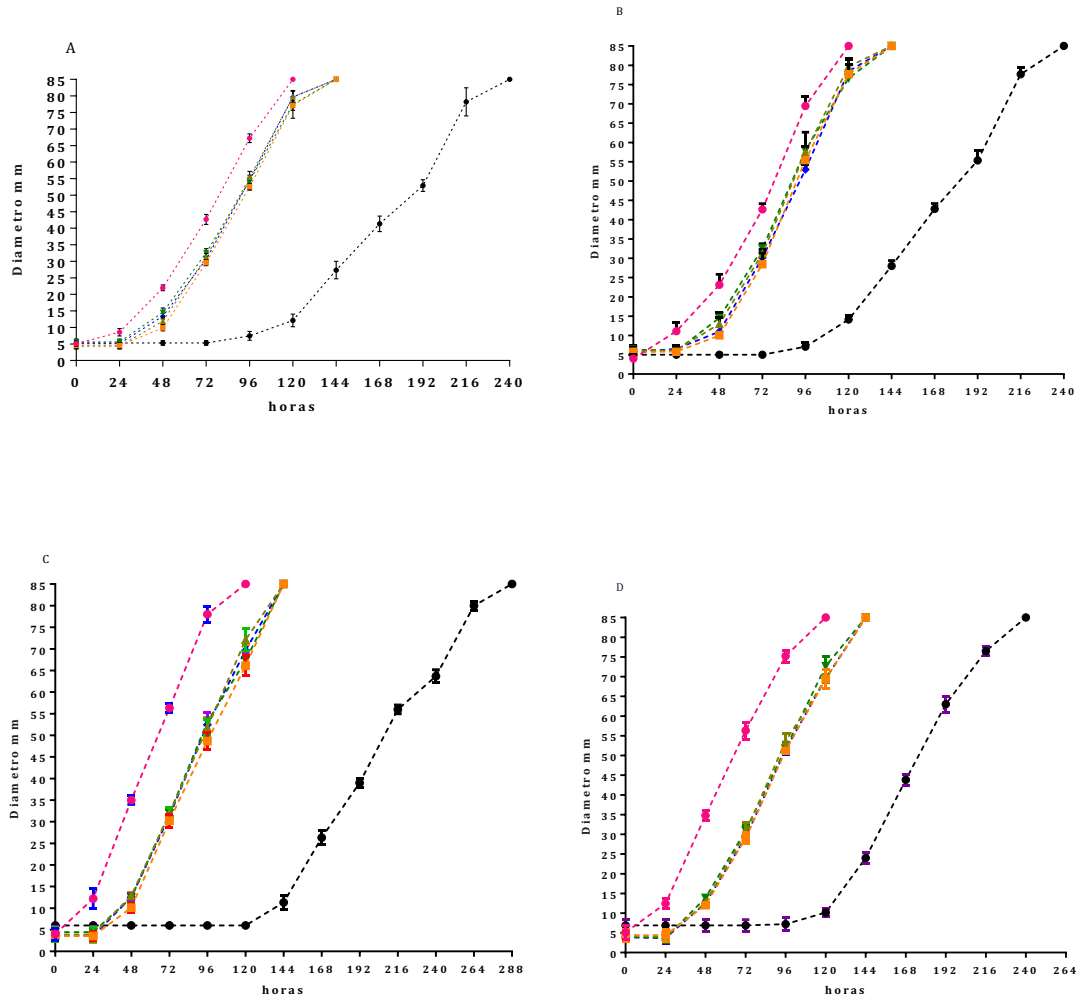


Figura 7: Cinéticas de crecimiento de *A. fumigatus*, en medio MEA-SLC_{70%} de PS fermentado con *L. plantarum* y gránulo CIDCA AGK1. A) Cinéticas de crecimiento de *A. fumigatus* I3, B) Cinéticas de crecimiento de *A. fumigatus* I4 C) Cinéticas de crecimiento de *A. Fumigatus* I12, D) Cinéticas de crecimiento de *A. Fumigatus* I37. ● Control positivo: Crecimiento fúngico en presencia de SLC de PS; ■ Crecimiento fúngico en presencia de SLC de PSFLp83114; ▼ Crecimiento fúngico en presencia de SLC de PSFLp8329; ▲ Crecimiento fúngico en presencia de SLC de PSFLp8316; ◆ Crecimiento fúngico en presencia de SLC de PSLp8346; ● Crecimiento fúngico en presencia de SLC de PSFK.

A partir de los gráficos se observa que los SLC obtenidos a partir del PS fermentado con cepas de *L. plantarum* tienen capacidad de aumentar el tiempo de latencia, pero la velocidad de crecimiento es bastante similar a la obtenida en el medio control. El SLC obtenido a partir de la fermentación con gránulo CIDCA AGK1 generó un aumento mayor frente a todos los demás tratamientos en el tiempo de latencia y una disminución en la velocidad de crecimiento, mostrando

una mayor capacidad de inhibición. *A. fumigatus* I3 e I4, presentaron menor tiempo de latencia, mientras que *A. fumigatus* I12 e 37 presentaron los tiempos de latencia más altos entre los *A. fumigatus* analizados, frente a SLC de PS fermentado con gránulos CIDCA AGK1.

A. terreus I6 y *A. minisclerotigenes* I5 tuvieron comportamientos similares, los cuales se observan en la figura 8.

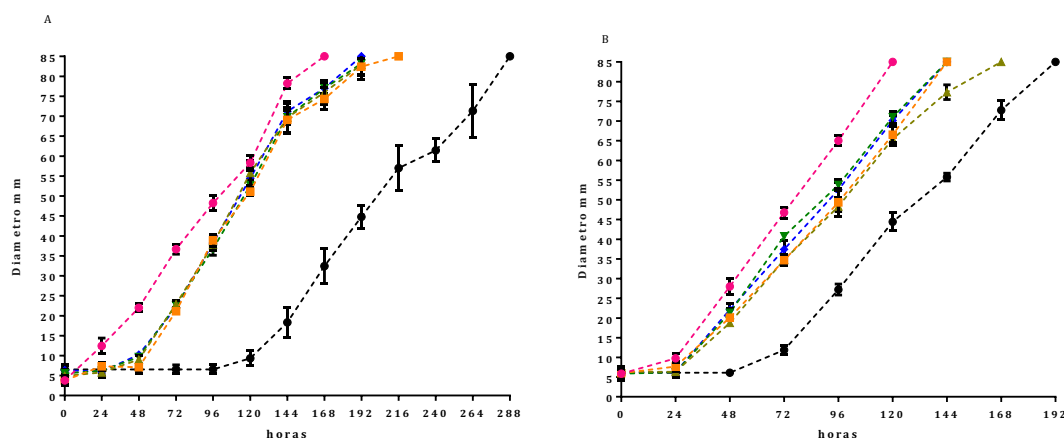


Figura 8: Cinéticas de crecimiento de *A. minisclerotigenes* y *A. terreus* en medio MEA adicionado de SLC de PS fermentado con *L. plantarum* y gránulo CIDCA AGK1 A) Cinéticas de crecimiento de *A. terreus* I6 B) Cinéticas de crecimiento de *A. minisclerotigenes* I5. ● Control positivo: Crecimiento fúngico en presencia de SLC de PS; ■ Crecimiento fúngico en presencia de SLC de PSFLp83114; ▼ Crecimiento fúngico en presencia de SLC de PSFLp8329; ▲ Crecimiento fúngico en presencia de SLC de PSFLp8316; ◆ Crecimiento fúngico en presencia de SLC de PSFLp8346; ● Crecimiento fúngico en presencia de SLC de PSFK.

Se puede observar que *A. terreus* I6 presentó un aumento en la fase de latencia por la presencia de los SLC de los PS fermentados, pero no tuvo una variación en la velocidad de crecimiento. *A. minisclerotigenes* I5 presentó un aumento en el tiempo de latencia por la presencia de los SLC de los PS fermentados. El SLC del PS fermentado con gránulos CIDCA AGK1 causó el mayor aumento en el tiempo de latencia y la mayor disminución en velocidad de crecimiento fúngica de todos los tratamientos. Esta capacidad inhibitoria ya ha sido evaluada anteriormente frente a otros hongos como *F. graminearum*, *A. parasiticus*, *A. flavus* en presencia de los sobrenadantes producidos por gránulos de

kefir, presentando en todos los casos una inhibición significativa (León Peláez 2013; Gamba et al. 2015a; Gamba 2015).

Para hacer un análisis más profundo de la alteración que producen los SLC de los PS fermentados en este ensayo, se obtuvieron los valores de velocidad de crecimiento (K_D) y tiempo de latencia (Lag) a partir de las curvas obtenidas (Molina & Gianuzzi, 1999).

Tabla 6: Parámetros cinéticos de crecimiento de *Aspergillus fumigatus*, en medio MEA adicionado con SLC de PS fermentado con *L. plantarum* y gránulo de kefir CIDCA AGKQ

SLC-PSF	Parámetro	<i>A. fumigatus</i> I3	<i>A. fumigatus</i> I4	<i>A. fumigatus</i> I12	<i>A. Fumigatus</i> I37
PS (Control positivo)	K_D (mm/h)	0,93±0,06 ^A	0,91±0,09 ^A	0,89±0,01 ^A	0,97±0,08 ^A
	Lag (h)	19,6±0,9 ^a	17,5±0,8 ^a	15,4±1,2 ^a	16,1±0,8 ^a
Lp84114	K_D (mm/h)	0,82 ± 0,06 ^B	0,83 ± 0,02 ^B	0,77 ± 0,02 ^B	0,78 ± 0,08 ^B
	Lag (h)	39,3 ± 0,5 ^b	39,0 ± 1,6 ^b	38,4 ± 1,5 ^b	35,9 ± 3,0 ^b
Lp8316	K_D (mm/h)	0,81 ± 0,03 ^B	0,80 ± 0,03 ^B	0,77 ± 0,03 ^B	0,77 ± 0,01 ^B
	Lag (h)	36,1 ± 0,5 ^c	34,5 ± 1,3 ^c	35,2 ± 0,4 ^c	35,6 ± 1,2 ^b
Lp8329	K_D (mm/h)	0,76 ± 0,01 ^C	0,77 ± 0,01 ^C	0,75 ± 0,01 ^C	0,77 ± 0,1 ^B
	Lag (h)	33,0 ± 0,7 ^c	32,0 ± 1,7 ^c	35,0 ± 1,3 ^c	34,8 ± 0,5 ^c
Lp8346	K_D (mm/h)	0,80 ± 0,051 ^B	0,82 ± 0,02 ^B	0,76 ± 0,06 ^C	0,76 ± 0,05 ^C
	Lag (h)	34,6 ± 0,4 ^c	37,9 ± 1,4 ^b	35,4 ± 0,6 ^c	37,0 ± 0,9 ^b
PSFK	K_D (mm/h)	0,6 ± 0,05 ^D	0,64 ± 0,03 ^D	0,53 ± 0,02 ^D	0,60 ± 0,08 ^D
	Lag (h)	107 ± 2,0 ^d	106,5 ± 1,2 ^d	124,9 ± 1,9 ^D	100,8 ± 1,0 ^d

SLC-PSF: Sobrenadante Libre de Células de Permeado de Suero Fermentado ^{a, b, c, d} letras minúsculas simbolizan diferencias significativas $\alpha < 0,05$ ANOVA. Seguido de Test de comparación múltiple en el tiempo de latencia. ^{A, B, C, D} simbolizan diferencias significativas $\alpha < 0,05$ ANOVA. Seguido de Test de comparación múltiple

SLC-PSF	Parámetro	A.	A.
		<i>terreus</i> I6	<i>minisclerotigenes</i> I5
PS (Control positivo)	K _D (mm/h)	0,58±0,02 ^A	0,77±0,08 ^A
	Lag (h)	16,3±1,7 ^a	17,2±2,1 ^a
Lp84114	K _D (mm/h)	0,48 ± 0,003 ^B	0,64 ± 0,004 ^B
	Lag (h)	29,5 ± 1,5 ^b	22,0 ± 0,9 ^b
Lp8316	K _D (mm/h)	0,54 ± 0,02 ^C	0,57 ± 0,01 ^C
	Lag (h)	32,9 ± 1,7 ^c	19,0 ± 0,2 ^c
Lp8329	K _D (mm/h)	0,54 ± 0,1 ^C	0,66 ± 0,1 ^B
	Lag (h)	34,1 ± 2,9 ^c	20,0 ± 0,2 ^c
Lp8346	K _D (mm/h)	0,55 ± 0,05 ^C	0,66 ± 0,05 ^B
	Lag (h)	33,6 ± 1,6 ^c	20,8 ± 0,8 ^c
PSFK	K _D (mm/h)	0,44 ± 0,08 ^D	0,51 ± 0,04 ^D
	Lag (h)	103,7 ± 5,2 ^d	40,4 ± 0,7 ^d

SLC-PSF: Sobrenadante Libre de Células de Permeado de Suero Fermentado ^{a, b, c, d} letras minúsculas simbolizan diferencias significativas $\alpha < 0,05$ ANOVA. Seguido de Test de comparación múltiple en el tiempo de latencia. ^{A, B, C, D} letras mayúsculas simbolizan diferencias significativas $\alpha < 0,05$ ANOVA. Seguido de Test de comparación múltiple en el velocidad de crecimiento.

Todos los SLC generaron cambios en los parámetros de crecimiento obtenidos. El tiempo de latencia es el parámetro que más se modificó en este ensayo. El SLC de PS fermentado con gránulos CIDCA AGK1 tuvo un efecto antifúngico significativamente superior al obtenido con los SLC de PS fermentado con *L. plantarum*, ya que disminuyó la velocidad de crecimiento de los hongos y aumentó el tiempo de latencia en los seis hongos desafiados. Los SLC de PS fermentado con *L. plantarum* aumentaron el tiempo de latencia de todos los hongos desafiados. El SLC de PS fermentado con *L. plantarum* CIDCA 83114 tuvo mayor capacidad de aumentar el tiempo de latencia (Lag). Seguido de este, el SLC

con mejor capacidad de modificar los parámetros de crecimiento de los hongos fue el PS fermentado con *L. plantarum* CIDCA 8346. Los SLC de los PS fermentados con *L. plantarum* CIDCA 8316 y CIDCA 8329 también presentaron aumento en el tiempo de latencia pero en valores menores con respecto a los descritos anteriormente.

El índice de incremento de la fase de latencia y el índice de inhibición de la tasa de crecimiento, relacionan los parámetros cinéticos obtenidos en cada tratamiento con aquellos calculados con el control positivo. Dado que en un tratamiento inhibitorio se espera que la fase de latencia aumente, el Índice de Incremento de la fase de latencia, se calculó según la fórmula descrita en la ecuación 7 de materiales y métodos.

$$III_{Lag} \% = \left[\frac{(Lag_{tratamiento} - Lag_{control})}{Lag_{control}} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde:

$Lag_{Tratamiento}$ = Tiempo de la fase Lag de cada tratamiento

$Lag_{Control}$ = Tiempo de la fase Lag del control

Los resultados se presentan en la figura 9.

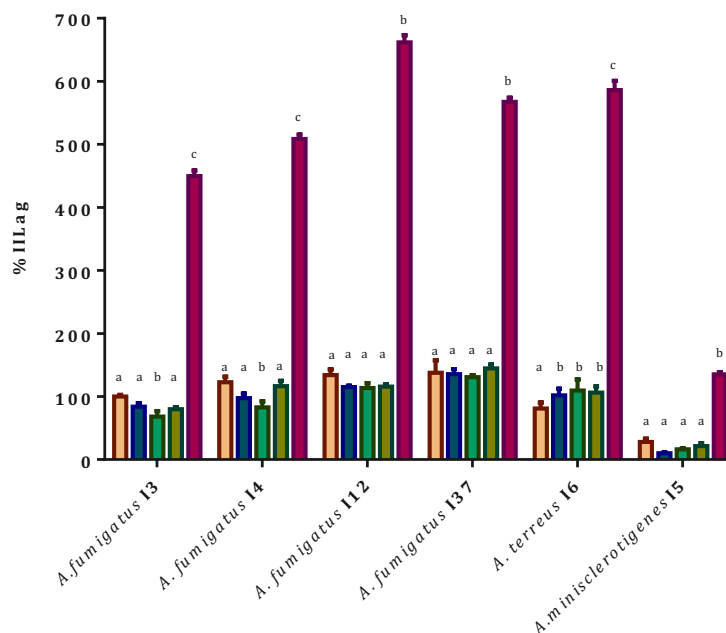


Figura 9: Porcentaje de Índice de Incremento de la fase de latencia (%IILag) de los hongos cultivados en medio MEA adicionado con SLC de PS fermentado con *L. plantarum* y gránulo de kefir CIDCA AGK1: ■ % IILag en presencia de SLC de PS fermentado con *L. plantarum* CIDCA 83114; ■ % IILag en presencia de SLC de PS fermentado con *L. plantarum* CIDCA 8316; ■ % IILag en presencia de SLC de PS fermentado con *L. plantarum* CIDCA 8326; ■ % IILag en presencia de SLC de PS fermentado con *L. plantarum* CIDCA 8346; ■ % IILag en presencia de SLC de PS fermentado con gránulo CIDCA AGK1. Las barras representan la desviación estándar Las letras simbolizan diferencias significativas $\alpha < 0,05$ ANOVA. Seguimiento de Test de comparación múltiple

Todos los hongos presentaron incremento en la fase de latencia, siendo *A. fumigatus* I37 el hongo que mayor incremento presentó en la fase de latencia con respecto a todos los tratamientos, seguido de *A. terreus* I6. *A. minisclerotigenes* I5 fue el hongo más resistente a la actividad antifúngica de los PS fermentados.

Por otra parte se observa el incremento en la fase de latencia que ocasionó el SLC de PS fermentado con gránulo de kefir CIDCA AGK1, teniendo un IILag de hasta 650% por encima del control. Esto indica que es una alta capacidad inhibitoria con respecto a la obtenida con SLC de PS fermentado con *L. plantarum*.

Experimentos realizados con SLC de leche fermentada con gránulos CIDCA AGK1, han demostrado que *A. flavus* AFUNL5 aumentó su tiempo de latencia en 24 h más con relación al medio control. En este caso se usó un medio MEA adicionado con SLC al 50% v/v. En ese estudio se concluyó que los SLC pueden ser usados

como biopreservante (León Peláez 2013). Los resultados obtenidos en esta investigación, coinciden con resultados obtenidos de otras soluciones biopreservante, que durante su uso como antifúngicos modifican principalmente el tiempo de latencia (León Peláez et al. 2012; Gamba et al. 2016b).

En la figura 9 que se muestra a continuación se obtuvieron los resultados de la modificación en la velocidad de crecimiento de los hongos, crecido en el medio modificado con SLC de los sueros fermentado con *L. plantarum* y los gránulos CIDCA AGK1.

En los estudios sobre el efecto antifúngico se espera que la velocidad de crecimiento disminuya, por lo que se calcula el porcentaje de Índice de inhibición de la velocidad de crecimiento $I I K_D$. El $I I K_D$ calculó relacionando la K_D obtenida en los tratamientos con la K_D obtenida en el medio control MEA-PS_{70%} con la formula descrita en la ecuación 6 de materiales y métodos.

Porcentaje de Inhibición de K_D ($I I K_D \%$):

$$I I K_D \% = \left[\frac{(K_{Dcontrol} - K_{Dtratamiento})}{K_{Dcontrol}} \right] \times 100 \text{ Ecuación 6}$$

Donde:

$K_{Dcontrol}$ = velocidad de crecimiento del control

$K_{DTratamiento}$ = velocidad de crecimiento de cada tratamiento

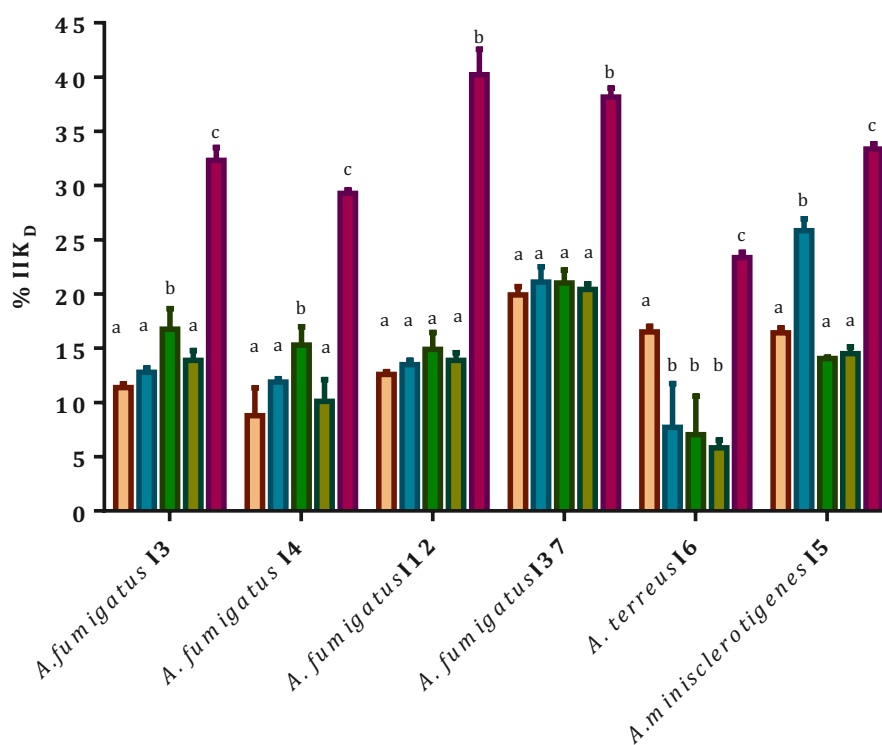


Figura 10: Porcentaje de Índice de Inhibición de la velocidad de crecimiento (%IIK_D) de los hongos cultivados en medio MEA adicionado con SLC de PS fermentado con *L. plantarum* y gránulo de kefir CIDCA AGK1: ■ %IIK_D en presencia de SLC de PS fermentado con *L. plantarum* CIDCA 83114; ■ %IIK_D en presencia de SLC de PS fermentado con *L. plantarum* CIDCA 8316; ■ %IIK_D en presencia de SLC de PS fermentado con *L. plantarum* CIDCA 8326; ■ %IIK_D en presencia de SLC de PS fermentado con *L. plantarum* CIDCA 8346; ■ %IIK_D en presencia de SLC de PS fermentado con gránulo CIDCA AGK1. Las barras representan la desviación estándar Las letras simbolizan diferencias significativas $\alpha < 0,05$ ANOVA. Seguimiento de Test de comparación múltiple

El SLC de PS fermentado con gránulo CIDCA AGK1 mostro la mayor capacidad antifúngica. En todos los casos los hongos presentaron mayor %IIK_D. La mayor capacidad antifúngica fue contra *A. fumigatus* I12 seguido de *A. fumigatus* I37. Entre los SLC de PS fermentado con *L. plantarum*, la mayor reducción de la velocidad de crecimiento se alcanzó con SLC de PS fermentado con *L. plantarum* CIDCA 8329.

La capacidad de disminuir la velocidad de crecimiento del hongo, nos permite decir que los SLC de *L. plantarum* y el granulo CIDCA AGK1, son potencialmente un bioconservante. Dado que los resultados *in vitro* demostraron que tienen capacidad antifúngica.

Además de la capacidad antifúngica de los microorganismos del kefir, otros estudios han demostrado la capacidad que tienen éstos de disminuir la concentración de AFB₁ en leche fermentada, PS y suero usando el gránulo o la FMK (Gamba et al. 2015b; Gamba et al. 2016b; Kendirci & Altug 2004; León Peláez 2013). Se pudo entonces tomar como objeto de estudio la fracción microbiana del kefir y el producto fermentado de los gránulos de kefir CIDCA AGK1.

Una vez determinada la capacidad inhibidora/reductora del crecimiento fúngico por parte de los microorganismos seleccionados sobre el crecimiento de los hongos contaminantes del alimento para pollos, se procedió a evaluar su capacidad de secuestrar aflatoxinas y de reducir el daño producido por éstas en líneas celulares, tal como se verá a continuación.

3. Capacidad de protección y captura de aflatoxina B₁ (AFB₁) por *Lactobacillus plantarum* y la fracción microbiana del gránulo CIDCA AGK1 (FMK)

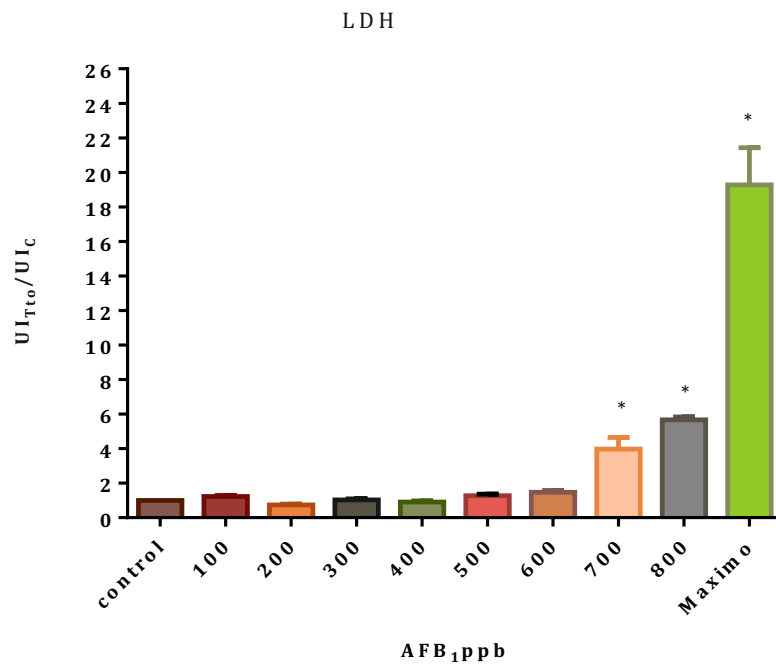
Se determinó la capacidad microbiana de reducir la citotoxicidad de las aflatoxinas, en un modelo celular de hepatocarcinoma. La capacidad de secuestro de micotoxinas por los microorganismos del kefir se determinó mediante experimentos donde se desafiaban coincubando en un mismo medio líquido las cepas de *L. plantarum* y/o la Fracción Microbiana del Kefir (FMK) del gránulo CIDCA AGK1, con concentraciones predeterminadas de Aflatoxina B₁ (AFB₁). Una vez terminada la etapa de desafío, se separaban por centrifugación los microorganismos del sobrenadante y la cantidad de aflatoxina secuestrada se determinaba indirectamente al medir la cantidad de aflatoxina residual en el caldo, por HPLC.

3.1 Determinación del daño de las células HepG2 frente a la exposición a aflatoxina B₁ (AFB₁)

Las células HepG2 son células de hepatoma humano usadas como modelos para estudiar la acción tóxica de xenobióticos sobre las células del hígado (Che et al. 2012; McKean et al. 2006). El modelo de estudio empleó los microorganismos

sobre las células hepáticas para determinar la capacidad de protección y daño por parte de AFB₁ en el modelo.

El daño causado por AFB₁ adicionada en diferentes concentraciones sobre el modelo celular HepG2 se determinó midiendo la actividad biológica celular a través de la concentración de las enzimas Lactato Deshidrogenasa (LDH) y Aspartato Amino Transferasa (AST). Como control negativo de daño se incubaron las células con DMEM y como control positivo para determinar el daño máximo, se incubaron las células con agua destilada estéril. En la figura 15 se presenta el daño celular determinado con diferentes concentraciones de aflatoxina AFB₁, el control positivo con agua destilada estéril y el control negativo del daño.



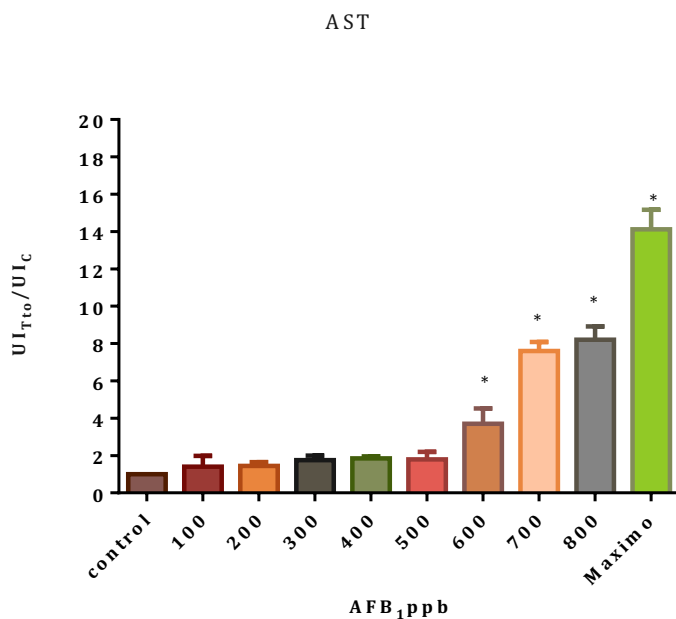


Figura 11: Determinación de daño celular mediante relación de la concentración de enzimas en el sobrenadante de células HepG2 desafiadas con diferentes concentraciones de aflatoxina AFB₁. A) Determinación del daño celular mediante actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) a concentraciones entre 100 y 800ppb de AFB₁. B) Determinación del daño celular mediante actividad de la enzima Aspartato Amino Transferasa (AST), a concentraciones entre 100 y 800 ppb de AFB₁. Los datos fueron todos graficados en relación al control (UI tratamientos/ UI control).

*Representa las concentraciones donde hay diferencias significativas con respecto al control. Las barras representan la desviación estándar * simbolizan diferencias significativas $\alpha < 0,05$ ANOVA. Seguimiento de Test de comparación múltiple

El daño celular causado por 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 (Jauregui et al. 1981; Kakisu et al. 2013b; Stoddart 2011). En la figura 11A se observa que las células HepG2 tuvieron aumento significativo del daño y liberación de enzima LDH, con respecto al control negativo, a concentraciones de 700 y 800 ppb de AFB₁, evidenciando el daño provocado por la aflatoxina en la membrana celular. El daño a 700 y 800 ppb es un indicador de muerte celular; ya que el daño de la membrana celular, la pérdida de LDH intracelular y su salida al medio de cultivo constituyen un daño irreversible en la membrana (Fotakis & Timbrell 2006).

Se han realizado otros estudios en el grupo de investigación y otros, empleando la medida de LDH como marcador del daño ocasionado en la células HepG2 por efecto de la AFB₁, en los cuales también se determinó que la concentración de LDH aumentaba en relación al aumento de la concentración de AFB₁(Choi et al. 2010; Gamba et al. 2015b; Robert et al. 2017). Mediante el uso de esta técnica, no pudo evidenciarse diferencia significativa en el daño celular con respecto al control negativo con concentraciones de AFB₁ inferiores a 700 ppb. No puede descartarse que ocurran otro tipo de deterioros en la célula en presencia de concentraciones menores.

La figura 11B presenta el daño celular calculado con la medición de enzima Aspartato Amino Transferasa (AST) en el sobrenadante de las células. La AST presentó un aumento significativo con respecto al control negativo a concentraciones de 600, 700 y 800 ppb de AFB₁. La enzima hepática Aspartato aminotransferasa (AST) es un marcador bioquímico para determinación del daño hepático agudo. Esto se debe a que esta enzima se localiza en los hepatocitos, donde participan del metabolismo de los aminoácidos y de reacciones de trasaminación. Sus actividades séricas aumentan como resultado del daño de la membrana celular (Gowda et al. 2009). Se ha demostrado que las células HepG2 aumentan la permeabilidad de esta enzima cuando sufren daño en la membrana celular, principalmente en procesos apoptóticos o de necrosis (Su et al. 2016). Sin embargo, alrededor del 80% de la actividad AST del hígado es aportada por la isoenzima mitocondria, en virtud de lo cual, el incremento en su detección en sueros o sobrenadantes indicaría daño mitocondrial, con un concomitante daño celular (Dan et al. 2005). El aumento en la concentración de AST en este trabajo dependió de la dosis, viéndose que a mayor concentración de AFB₁ mayor permeabilidad de la enzima hacia el sobrenadante, dando como resultado la detección del daño. Comparando las dos mediciones de enzimas, se puede decir que el daño se ve manifestado a inicialmente por la medida de AST a partir de 600ppb de AFB₁, y después por LDH partir de 700 y 800 ppb de AFB₁.

A fin de garantizar que la concentración de enzima empleada en los estudios de protección por microorganismos del kefir, causara diferencia

significativa en el daño frente al control, se decidió trabajar a una concentración de 800 ppb de AFB₁ en el modelo celular HepG2.

3.2. Efecto sobre la citotoxicidad causada por aflatoxina AFB₁ en células HepG2 mediante la utilización de *Lactobacillus plantarum* y la fracción microbiana obtenida de los gránulos de kefir CIDCA AGK1 (FMK).

Con los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, se observó una relación lineal entre la concentración de AFB₁ y el daño producido sobre las células HepG2 mediante la medición de las enzimas LDH y AST. Por lo tanto, se consideró que ambos métodos son útiles para el estudio de la capacidad protectora de los microorganismos del kefir en células HepG2 contra el daño causado por AFB₁. Las células HepG2 se desafiaron con AFB₁ disuelta en DMEM, en concentración de 800 ppb, en presencia de los microorganismos estudiados. Para ello se aplicaron tres tratamientos en los cuales la aflatoxina AFB₁ resuspendida en DMEM se coincubó durante 15 minutos con:

- La Fracción de microorganismos totales del gránulo de kefir CIDCA AGK1 (FMK).
- Cada uno de los *L. plantarum* CIDCA 83114, 8316 8329 y 8346 por separado.
- La mezcla de todos los *L. plantarum* seleccionados (PoolLp).

Una vez terminada la coincubación, se adicionó cada tratamiento sobre las células HepG2 y se dejó incubando por 24 horas al final de las cuales se hizo la lectura de la actividad enzimática de LDH y de AST.

El control negativo del daño consistió en las células incubadas con DMEM y el control positivo del daño en células incubadas con agua destilada estéril.

En un ensayo previo se comprobó que los microorganismos por sí solos no aumentaron la concentración de las enzimas medidas (datos no mostrados) encontrándose que los valores son similares a los del control negativo de DMEM.

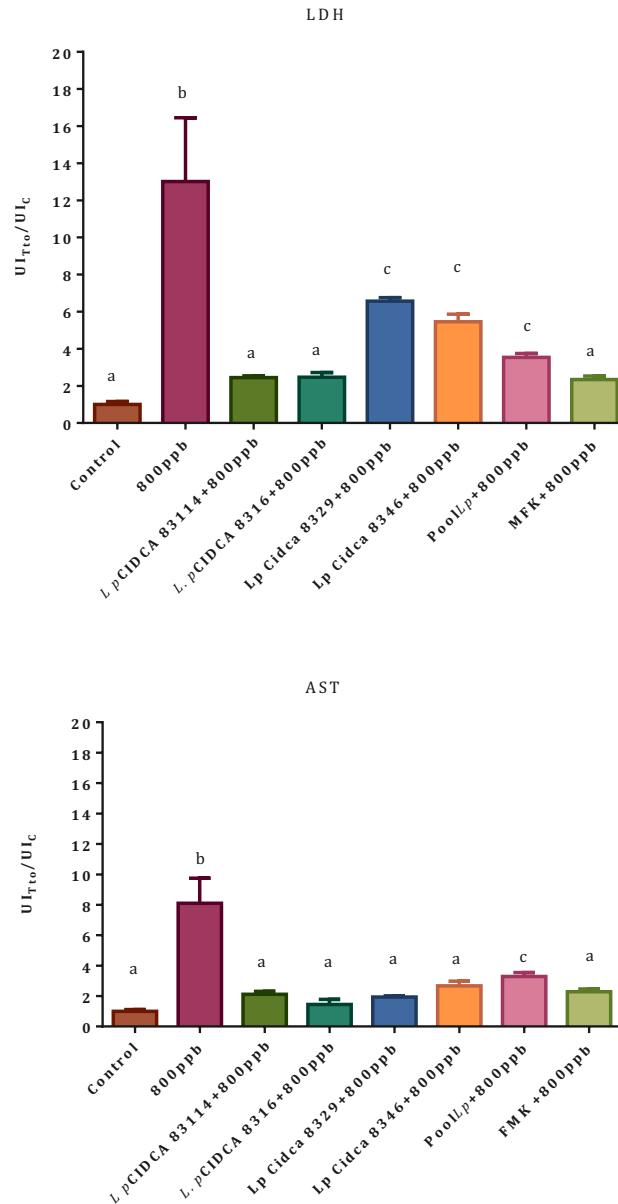


Figura 12: Determinación del daño celular en células HepG2 por AFB₁ en presencia de *L. plantarum* y la fracción microbiana del gránulo de kefir CIDCA AGK1 (FMK) mediante relación de la concentración de enzimas en el sobrenadante celular. A) Determinación del daño celular por AFB₁ en presencia de *L. plantarum* y FMK mediante actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH). B) Determinación del daño celular por AFB₁ en presencia de *L. plantarum* y FMK mediante actividad de la enzima Aspartato Amino Transferasa (AST). Los datos fueron analizados con relación al control.FMK: Fracción microbiana del gránulo CIDCA AGK1, PoolLp: *L. plantarum* CIDCA 83114, CIDCA 8316 CIDCA 8329 CIDCA 8346 juntos^{a, b, c} letras diferentes indican que hay diferencias significativas P<0,05

Todos los tratamientos realizados disminuyeron el daño celular de la línea HepG2 en presencia de 800 ppb de AFB₁. El control de daño negativo tuvo diferencias significativas con respecto a las células desafiadas con 800 ppb de AFB₁, demostrándose el daño. Una vez que se adicionó la aflatoxina coincubada con cada tratamiento, el daño disminuyó. En el caso de *L. plantarum* CIDCA 83114,

CIDCA 8316 y FMK, los valores llegaron a ser similares a los del control negativo, sin diferencias significativas. Por otro lado *L. plantarum* CIDCA 8329, CIDCA 8346 y PoolLp, no llegaron a normalizar los valores con relación al control, aunque si presentaron valores significativamente menores con respecto al daño celular en presencia de AFB₁, demostrando por consiguiente su capacidad de protección. Se pudo comprobar que tanto las cepas aisladas como en conjunto (PoolLp) y la FMK tienen capacidad protectora en el modelo celular HepG2. Además es importante resaltar que los tratamientos se hicieron con microorganismos que habían sido sometidos a pasteurización, y que en consecuencia, se obtuvo un efecto protector con microorganismos no viables.

En la figura 12B, se presentan los resultados obtenidos de la lectura de la AST en los tratamientos indicados. Todos los tratamientos tuvieron capacidad de disminuir el daño, evidenciándose en la disminución de la enzima en el sobrenadante. El control negativo del daño y la dosis sola de AFB₁ presentaron diferencias significativas corroborando el daño causado por la aflatoxina. Las cepas de *L. plantarum* y FMK no presentaron diferencias significativas con respecto al control negativo del daño, demostrando que son capaces de proteger en el modelo celular normalizando los valores con respecto al control. Si bien PoolLp presentó diferencias significativas con respecto al control, también presentó diferencias con respecto a la dosis ensayada, por lo tanto demostró capacidad de protección.

La medida de ambas enzimas permitió evidenciar que las cepas de *L. plantarum*, FMK y PoolLp tiene capacidad de proteger frente al daño con AFB₁ en el modelo celular HepG2. Sin embargo, *L. plantarum* CIDCA 83114, 8316 y la FMK mostraron tener mayor protección con respecto a las enzimas medidas, ya que en ambas, tanto LDH, como AST, los valores obtenidos fueron similares al control, puede decirse que evitaron el daño por la exposición a AFB₁. *L. plantarum* CIDCA 8329, 8346 y el PoolLp no evitaron completamente el daño causado por AFB₁, pero si lo disminuyeron significativamente. En concordancia con estos resultados Gamba et al. 2015 demostraron que la FMK tiene capacidad de disminuir la citotoxicidad (Determinación de actividad deshidrogenasa mitocondrial MTT) generada por AFB₁ en la línea celular HepG2.

Por otra parte se ha demostrado el efecto protector de cepas aisladas sobre la línea celular HepG2 con *Lactobacillus acidophilus* VM 20, que presentó capacidad de secuestro de Ocratoxina A-OTA por encima del 95% y *Bifidobacterium animalis* VM 12, redujo la concentración de Patulina-PAT en un 80%. (Fuchs et al. 2008).

La capacidad de protección de cepas aisladas de kefir frente a diferentes patógenos ha sido estudiada en diferentes líneas celulares. *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* CIDCA 133 y *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 evitaron el desprendimiento de la monocapa celular Hep-2 causada por el efecto de *Escherichia coli* enterohemorrágica (Hugo et al. 2008). Gerbino (2013), demostraron que *Lactobacillus kefiri* CIDCA 8348 fue capaz de eliminar concentraciones de cadmio tóxicas para la línea celular HepG2 mientras que Carasi et al. (2012) demostraron que esta cepa presenta una alta adhesión a las células Caco 2 TC7 y es capaz de antagonizar el efecto citotóxico de las toxinas de *Clostridium difficile* en células Vero. Todos estos estudios permiten concluir que las cepas aisladas de kefir tiene un alto potencial probiótico.

Otro estudios demostraron que la protección que confieren los lactobacilos, no solo se debe a la capacidad de captura individual de toxinas como las AFB₁, si no a que también disminuyen el daño que causa la toxina en el ADN de las líneas celulares Caco-2, que fueron desafiadas con *L. rhamnosus* GG contra AFB₁, que además de demostrar captura de hasta un 61%, evitó el daño de la membrana celular (Gratz 2007).

4.3 Capacidad de captura de AFB₁ por *Lactobacillus plantarum* y la fracción microbiana obtenida de los gránulos de kefir CIDCA AGK1 (FMK)

En estudios anteriores realizados en el grupo de investigación, se había determinado la capacidad de algunos microorganismos aislados del kefir y de la FMK de secuestrar aflatoxina AFB₁ a concentraciones de 150 ppb, bajo diferentes condiciones de coincubación (León Pelaéz 2013; Gamba 2015). Estos resultados previos sirvieron como base para estudiar la capacidad de cada lactobacilo seleccionado y de la FMK de secuestrar AFB₁ en la concentración estudiada y bajo diferentes condiciones de coincubación.

Se estudió en un primer paso la capacidad de secuestro de AFB₁ por los microorganismos a dos concentraciones diferentes, a fin de determinar si la protección celular puede verse relacionada con el secuestro y analizar si éste cambia con el incremento en la concentración de aflatoxina. La AFB₁ se diluyó las diferentes concentraciones en PBS a y se coincubó con un pellet de cada lactobacilo o de la FMK, obtenidos según lo descrito en Materiales y Métodos. Una vez finalizada la coincubación, se procedió a medir la concentración final en el PBS, por medio de HPLC. En la tabla 7 se observan los resultados.

Tabla 7: Porcentaje de captura de AFB₁ a 300ppb y 500ppb con *Lactobacillus plantarum* y la FMK

Cepas <i>L. plantarum</i> CIDCA	% captura 300ppb	%captura 500ppb	%captura 800ppb	Recuento de viables
83114	34,2 ± 2,3	26,5 ± 1,3	4,6 ± 1,6	1,01x10 ¹⁰ ± 5x10 ⁸
83114 (no viables)	32,6 ± 1,8	NM	NM	
8316	21,7 ± 1,6	4,3 ± 0,5	2,6 ± 0,8	8,9x10 ⁹ ± 4,2x10 ⁹
8316 (no viables)	20,90 ± 2,0	NM	NM	
8329	16,4 ± 0,6	10,2 ± 1,9	3,8 ± 1,0	2x10 ¹⁰ ± 1,3x10 ⁹
8329 (no viables)	15,9 ± 1,2	NM	NM	
8346	0	4,3 ± 0,5	0	8,6x10 ⁹ ± 1,5x10 ⁹
8346 (no viables)	0	NM	NM	
FMK	36,5 ± 1,5	26,0 ± 8,4	10,0 ± 1,4	BAL: 5,9x10 ⁸ ± 2,1x10 ⁷ LEV: 2x10 ⁸ ± 4,2x10 ⁷ BAA: 4,5x10 ⁸ ± 2,8x10 ⁸
FMK (no viables)	37,4 ± 2,3	NM	NM	

0: no hubo secuestro. No viables: Microorganismos sometidos a pasterización. NM: No medido

Los estudios de la capacidad de secuestro se realizaron a 300, 500, y 800 ppb para las bacterias y los FMK, obteniéndose capacidad de captura en todos los casos a excepción de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8346.

En el estudio se encontró que la FMK es la que mayor capacidad de captura presenta, seguido *L. plantarum* CIDCA 83114, posteriormente están *L. plantarum* CIDCA 8316 y *L. plantarum* CIDCA 8329. Se encontró que a mayor concentración de AFB₁ menor es la capacidad de las cepas de capturar AFB₁. *L. plantarum* CIDCA 8346 presentó una muy baja capacidad de captura. Se estudió si había variación en la capacidad de captura a tres concentraciones. Los resultados observados en la

tabla permiten concluir que hubo una reducción en la capacidad de captura en relación al aumento de la concentración de AFB₁. Dado que la captura de la AFB₁ por parte de la bacteria es un proceso químico que sucede en la pared, es muy probable que exista una concentración máxima a la cual tiene lugar un máximo de captura. Por lo tanto esta capacidad disminuye a medida que aumenta la concentración de la aflatoxina.

Por otra parte se midió el porcentaje de captura a 300 ppb desafiando a los microorganismos previa pasterización. En ninguno de los casos se encontraron diferencias significativas comparándolos con los microorganismos viables. Demostrando que la capacidad de secuestro está íntimamente ligada a la interacción química de la pared de los microorganismos.

Diferentes bacterias lácticas demostraron ser eficientes en la remoción de AFB₁ y ZEA de distintos medios líquidos, actuando como secuestrantes biológicos(El-Nezami et al. 1998).

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 et al. 1998; Gratz et al. 2005; Thyagaraja & Hosono 1994). Para AFB₁ se conoce que este proceso responde a una adsorción de tipo física (pared celular bacteriana- AFB₁) en un proceso de menos de 1 minuto, siendo la unión reversible tanto en bacterias vivas como muertas y dependiente de la cantidad de toxina y de la concentración bacteriana (Bueno et al. 2007).

León Peláez (2013) demostró que las bacterias aisladas de kefir tienen capacidad de captura diferente según la condiciones de crecimiento como: temperatura, pH y tiempo de exposición, en el trabajo mostró que *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 presentó una capacidad de captura de 59,3% cuando estaba crecido en MRS y de 52,1% cuando estaba en PS atribuyendo estas diferencias a la composición de la pared de la bacteria crecida en diferentes medios, para nuestros estudios los *Lactobacillus plantarum* se obtuvieron del crecimientos en MRS, facilitando así un mejor porcentaje de captura.

Posteriormente en el mismo trabajo demostraron que el porcentaje de hidrofobicidad no está relacionado con la capacidad de captura, ni con el tiempo de exposición, dado que la bacteria no presentó diferencias significativas entre la captura a 30 min comparada con 48 h de desafío. Sin embargo, el pH si altero la capacidad secuestrante de la FMK, los lactobacilos y las levaduras aisladas de kefir, teniendo los mejores porcentajes de captura a pH cercanos a 7,1 (León Peláez 2013). Todos estos resultados los obtuvieron manteniendo constante la concentración de AFB₁ en la solución de trabajo; nuestro trabajo planteado varió la concentración de toxina, y demostró que *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, 8316, 8329 y la FMK disminuyen la capacidad de captura en relación al aumento de la concentración, aun cuando se mantiene en las mejores condiciones de temperatura, pH y tiempo de exposición. No así para *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 demostrando así que esta variación es cepa dependiente.

A modo de análisis de los datos, se tomaron datos de estudios previos del grupo, para construir una curva de captura que indicase los cambios de acuerdo a la concentración de aflatoxina, incluyendo la máxima concentración empleada para los ensayos en células en el estudio . Figura 19.

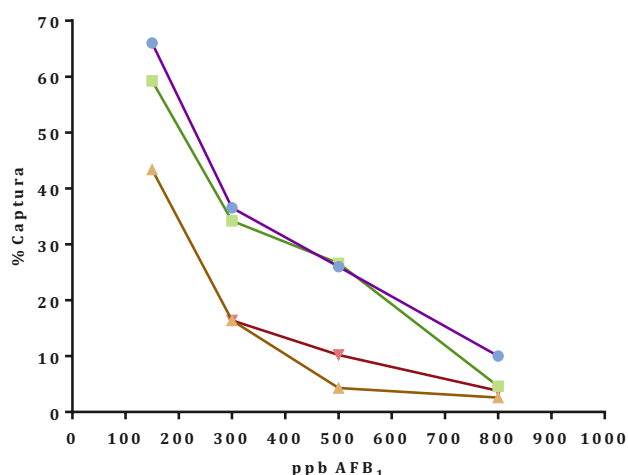


Figura 13: Curva de análisis captura de AFB₁ por las cepas seleccionadas y la FMK. ●FMK ■*Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 ▲*Lactobacillus plantarum* CIDCA 8316 ▼*Lactobacillus plantarum* CIDCA 8329.

Al evaluar como variaba la capacidad de secuestro de los FMK, se pudo determinar que esta disminuye cuando la concentración aumenta. Pasando de un

66% en 150 ppb hasta un 10% cuando se desafiaron con 800ppb. En el caso de las cepas de *Lactobacillus plantarum* encontramos que hay un efecto cepa dependiente, se pudo evidenciar que *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, CIDCA 8316 y CIDCA 8326 tienen capacidad de capturar AFB₁ y al igual que con los microorganismos del kefir, esta capacidad disminuye en relación al aumento de la concentración de la misma. Contrario a los otros resultados, *L. plantarum* CIDCA 8346, sólo demostró capacidad de captura desafiada con AFB₁ a 500 ppb.

Se demostró que los microorganismos estudiados secuestran AFB₁ a varias concentraciones incluyendo la empleada en los estudios de protección celular en la línea HepG2. No obstante, el secuestro de AFB₁ fue muy bajo a 800 ppb, la cual fue la concentración empleada para dicho estudio, indicando que así parte de la protección celular se deba a que la aflatoxina está adherida a la pared celular, parte de ésta debe responder a otro mecanismo. Es posible que haya una interacción de tipo físico entre los microorganismos muertos y las células, por la cual ellos interfieran en el ingreso de las aflatoxinas a las células, causando así el daño celular.

Conclusiones

- ❖ Se identificaron seis hongos aislados del ambiente de cría de pollos parrilleros. Los hongos encontrados fueron *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, y *Aspergillus minisclerotigenes*. Esta identificación permitió establecer en el alto riesgo de contaminación en que permanecen los ambientes, alimentos, agua y aire de los pollos parrilleros.
- ❖ Todas las cepas de *L. plantarum* demostraron actividad antifúngica mediante la técnica de sobre capa contra los hongos desafiados.
- ❖ Los sobrenadantes libres de células de los permeados de suero fermentados con *L. plantarum* presentaron capacidad antifúngica, reduciendo la germinación de los conidios de los hongos desafiados. El SLC de PS fermentado con gránulos CIDCA AGK1 presentó la mayor capacidad antifúngica, reduciendo la germinación de conidios con diferencias significativas con respecto a *L. plantarum*.
- ❖ Los SLC de los PS fermentado con *L. plantarum* y el gránulos CIDCA AGK1, tuvieron capacidad de aumentar el tiempo de latencia y disminuir la velocidad de crecimiento de los hongos.
- ❖ La capacidad antifúngica de los SLC de los PS fermentados con *L. plantarum* y el granulo CIDCA AGK1 se atribuye principalmente al contenido de ácido orgánicos, que se generan en la fermentación.
- ❖ Las cepas de *L. plantarum* aislados, el conjunto de éstos (poolLp) y la Fracción Microbiana del Kefir (FMK) presentaron reducción de la citotoxicidad *in vitro*, en el daño causado por la AFB₁ en la línea celular HepG2.
- ❖ Las cepas de *L. plantarum* CIDCA 83114, 8316, 8329 y la FMK tienen capacidad de capturar AFB₁.
- ❖ La capacidad de *L. plantarum* CIDCA 83114, 8316, 8329 y la FMK captura de AFB₁ disminuye a medida que aumenta la concentración de ésta.

Capítulo III

Administración de cepas probióticas de kefir y sus productos fermentados a pollos parrilleros

Introducción

La industria avícola es una de las más dinámicas y con mayor expansión a nivel mundial, y el motivo de esta expansión se debe al aporte de una proteína de alta calidad para el consumo humano y de los cortos tiempos de producción.

En el desarrollo de sistemas productivos intensivos, se han presentado diferentes desafíos frente a las enfermedades que pueden llegar a desarrollar los animales. La salud animal y el rendimiento del crecimiento se ven afectados por muchos factores, como la dieta, el estrés, los antibióticos y las prácticas modernas de cría. Los antibióticos se han incorporado como promotores de crecimiento en alimentos para pollos de engorde durante los últimos 40 años. La microbiota gastrointestinal de pollos de engorde sanos puede mantenerse estable mediante el uso de antibióticos en dosis preventivas (Daşkiran et al. 2012; Zulkifli et al. 2000), generando efectos positivos en los parámetros productivos. Sin embargo, los antibióticos pueden tener efectos secundarios adversos indirectos con implicaciones para la salud humana a través del consumo de alimentos de origen animal. El aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos en los seres humanos ha causado un mayor interés público y gubernamental para eliminar el uso subterapéutico de algunos antibióticos de la producción avícola (Caly et al. 2015). La Comunidad Europea (CE) decidió eliminar y prohibir la comercialización y el uso de antibióticos como promotores de crecimiento en los alimentos para animales (Reglamento CE n.º 1831/2003) pero aun hoy se usan en muchos países de América Latina y el Caribe. Muchos de estos antibióticos o sus residuos pueden permanecer en los tejidos animales que se destinan al consumo humano (Phillips et al. 2003).

La suplementación con probióticos se puede considerar como una alternativa para disminuir el uso de antibióticos (Blajman et al. 2014; Frizzo et al. 2011). También conocidos como microorganismos de alimentación directa, los probióticos se clasifican como microorganismos vivos no patógenos que son capaces de mantener una microbiota gastrointestinal normal (Patterson & Burkholder 2003; Rinttilä & Apajalahti 2013). Existe un interés en la búsqueda de alternativas viables a los antibióticos; es así que la suplementación de las dietas

con probióticos se plantea como una opción interesante (Colello et al. 2015; Yeo & Kim 1997). El uso de probióticos en animales de producción está destinado a mejorar la conversión alimenticia, a promover el crecimiento e inhibir el desarrollo de bacterias patógenas (Rosmini et al. 2004; Blajman et al. 2015). El avance en el estado del conocimiento sobre el uso de probióticos puede sustituir las terapias con antibióticos y brinda así una nueva alternativa menos agresiva para los animales (Caly et al. 2015; Charteris et al. 1998).

Los datos de la literatura ofrecen una variedad de resultados dispares en lo referente a la eficacia de los probióticos como promotores de crecimiento. Mientras que algunos autores han reportado que los probióticos mejoran los parámetros productivos de las aves (Acosta et al. 2007; Kim et al. 2012; Trabelsi et al. 2016). Otros han reportado investigaciones en las que los probióticos carecen de efectos positivos (Nunes et al. 2012; Pedroso et al. 2013; Zhang & Kim 2014). La variabilidad en los resultados puede deberse a que al incorporar a la alimentación los probióticos, éstos proceden de otras regiones geográficas o incluso de otras especies animales; a las cepas usadas, a las dosis, a la composición de la dieta, a las estrategias de alimentación y a la interacción con otros aditivos alimentarios en la ración diaria (Patterson & Burkholder 2003). A su vez, el comportamiento animal en respuesta a la adición de probióticos está influenciado por múltiples factores, entre los cuales se encuentran la edad, la raza, el tipo de explotación, el uso de antibióticos, el estrés y el ambiente de la crianza, por lo que considerar estos factores es un punto crítico antes de utilizar estos productos (Rosmini et al. 2004).

Las vías de administración de probióticos más empleadas en aves son la inclusión en el agua de bebida o la pulverización; con menos frecuencia los productos son agregados directamente a los comederos o mezclados con el alimento y finalmente la aplicación en dosis individuales se limita a criaderos con bajo número de individuos (Schneitz 2005). La adición de los probióticos en el agua de bebida fue la primera forma de administración testeada a campo, dando resultados exitosos (Eckert et al. 2010; Olnood et al. 2015). Sin embargo, se han citado como desventajas de esta forma de administración el consumo desigual por individuo, la pérdida de viabilidad de algunos microorganismos anaeróbicos o sensibles al cloro del agua y la imposibilidad de administrar el producto a pollos

recién nacidos. Hasta hoy sigue siendo la práctica más común, eficaz, y con mejores rendimientos productivos en la cría de pollos. Dado que esta vía de administración se ha desarrollado ampliamente, se decidió emplearla para estudiar el efecto de la administración de los microorganismos seleccionados en pollos.

En esta investigación se administraron los microorganismos que se evaluaron *in vitro* en los capítulos anteriores, a pollos parrilleros. Las cepas seleccionadas demostraron tener efecto antifúngico sobre hongos filamentosos aislados en zonas de cría de pollos y capacidad de captura de aflatoxina AFB₁. La dieta sólida de los animales no fue modificada en sus condiciones normales; y los microorganismos se administraron a los animales siendo adicionados como aditivo en el agua de bebida. Se evaluó el efecto del consumo de estos microorganismos en varios períodos de la cría determinando su influencia tanto en los parámetros productivos como en los parámetros fisiológicos del animal.

Objetivos

- ❖ Determinar la resistencia de las cepas de *L. plantarum* CIDCA 83114, 8316 8329 8346 y la fracción microbiana del kefir a las condiciones del agua clorada y tiempo de permanencia.
- ❖ Determinar la resistencia de cepas de *L. plantarum* CIDCA 83114, 8316 8329 8346 y la fracción microbiana del kefir a las condiciones gastrointestinales de pollos parrilleros.
- ❖ Evaluar el efecto en los parámetros productivos de pollos parrilleros, de la adición en el agua de bebida del permeado de suero fermentado con *L. plantarum* CIDCA 83114 (PSF114).
- ❖ Analizar el efecto a nivel fisiológico y de salud de pollos parrilleros, de la adición en el agua de bebida del PSF114.
- ❖ Evaluar el efecto en los parámetros productivos de pollos parrilleros, de la adición en el agua de bebida de la fracción microbiana del kefir y las cepas de *L. plantarum* CIDCA 83114, 8316 8329 8346 (FMKLP).
- ❖ Analizar el efecto a nivel fisiológico y de salud de pollos parrilleros, de la adición en el agua de bebida de FMKLP.
- ❖ Evaluar la incidencia del consumo de FMKLP en la microbiota cecal de pollos parrilleros.

Resultados y discusión

1. Estudios previos a la administración de los microorganismos

1.1 Resistencia de los microorganismos al cloro libre en agua potable

Previo a la administración de los probióticos en el agua de bebida se realizó un estudio para garantizar la supervivencia de dichos microorganismos en el agua de bebida empleada en la granja del INTA, la cual presentaba determinados niveles de cloro libre.

En el transcurso de potabilización de agua se realizan varios procedimientos para garantizar la calidad de ésta. Una de las características del agua potable es la presencia de Cloro libre o residual que tiene la función de desinfectar o disminuir la carga microbiana, principalmente coliformes (OMS 1992). Según el Código Alimentario Argentino (CAA capítulo XII agua potable, 2012), la cantidad máxima que se puede encontrar en el agua potable es 0,5 ppm de cloro libre. Con base en estas recomendaciones los microorganismos se adicionaron al agua con concentraciones progresivas de cloro (entre 0-4 ppm) durante 8 horas a temperatura ambiente, al final del cual se realizaron recuentos de los microorganismos viables. En la tabla 1 se encuentran los recuentos iniciales de los microorganismos.

Tabla 1: Recuento de microorganismos previo a los ensayos de resistencia al cloro

Microorganismos	Recuento inicial
<i>L. plantarum</i> CIDCA 83114	$4,1 \times 10^7 \pm 1,0 \times 10^7$
<i>L. plantarum</i> CIDCA 8316	$2,9 \times 10^7 \pm 1,2 \times 10^7$
<i>L. plantarum</i> CIDCA 8329	$2,7 \times 10^7 \pm 6,7 \times 10^6$
<i>L. plantarum</i> CIDCA 4346	$2,8 \times 10^7 \pm 7,1 \times 10^6$
Bacterias Acido Lácticas (BAL) ¹	$1,5 \times 10^7 \pm 1,3 \times 10^6$
Bacterias Ácido Acéticas (BAA) ¹	$5,5 \times 10^7 \pm 2,7 \times 10^6$
Levaduras ¹	$3,8 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^6$

¹Comunidad de microorganismos correspondiente a la FMK

En la figura 1 se puede ver los resultados obtenidos con *L. plantarum* y la Fracción Microbiana del Kefir (FMK), que incluye BAL, BAA y levaduras.

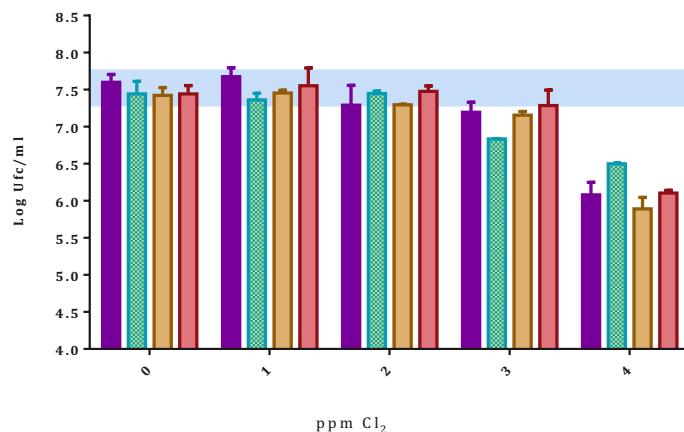


Figura 1: Viabilidad de los microorganismos probióticos en presencia de cloro libre en agua. Viabilidad en el agua para: *L. plantarum* CIDCA 83114; *L. plantarum* CIDCA 8316; *L. plantarum* CIDCA 8329; *L. plantarum* CIDCA 8346. La franja azul representa el Log UFC/ml de los recuentos iniciales.

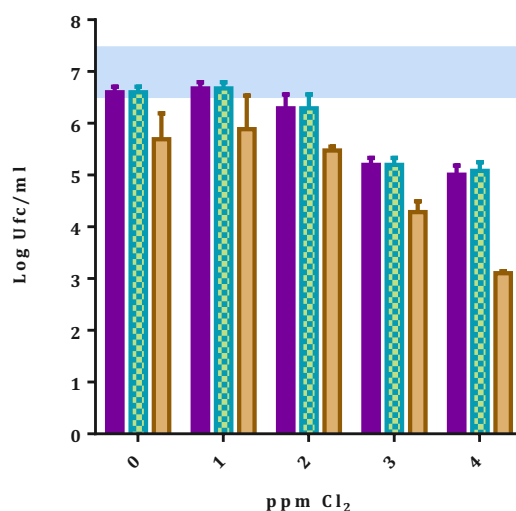


Figura 2: Viabilidad de los microorganismos de FMK en presencia de cloro libre en agua. Bacterias ácido lácticas; Bacterias ácido acéticas; Levaduras. La franja azul representa el Log UFC/ml de los recuentos iniciales.

Como se puede observar en la figura 1, el cloro libre en agua comienza a hacer un efecto sobre la viabilidad de los microorganismos a partir de 3 ppm de Cl₂ tanto para *L. plantarum*, como para la FMK. Las cepas de *L. plantarum* presentaron alta resistencia hasta una concentración de 3 ppm; *L. plantarum* CIDCA 8316 fue la menos resistente, ya que presentó una diferencia significativa con respecto al recuento inicial en una concentración de 3 ppm, donde descendió de $2,9 \times 10^7$ a $3,1 \times 10^6$ UFC/ml. En la figura 2, los microorganismos menos resistentes fueron las

levaduras, presentando un descenso en el recuento a 2 ppm de $3,8 \times 10^6$ a 1×10^3 UFC/ml; en las concentraciones de Cl_2 de 3 y 4 ppm disminuyeron el recuento de viables todos los grupos microbianos de la FMK (BAL, BAA y levaduras). La resistencia al cloro libre en agua representa para el estudio un desafío ya que la vía de administración de los probióticos puede determinar la capacidad que tienen los microorganismos de llegar vivos al intestino de los pollos y tiene una injerencia directa sobre el éxito del tratamiento. La vía de administración elegida en la inclusión de las cepas en pollos parrilleros fue el agua de bebida, ya que es una manera eficiente y rentable de administrar microorganismos a pollos parrilleros (Karimi Torshizi et al. 2010). Los resultados obtenidos sobre el efecto del cloro libre en la viabilidad de los microorganismos, coinciden con otros estudios donde se determinó que la adición de los probióticos en el agua de bebida ocasiona una mejora en la productividad, pero esta forma de administración puede presentar un descenso de microorganismos en el agua clorada, lo que afecta la concentración bacteriana óptima para ejercer los efectos benéficos en el hospedador (Eckert et al. 2010). A efectos de probar la resistencia microbiana en el agua que se emplearía en la crianza de los pollos se corroboró que el agua de los galpones cumpliera con lo estipulado en el Código Alimentario Argentino (CAA, capítulo XII agua potable), de un máximo de 0,5 ppm. Una vez obtenidos los resultados, se concluyó que el agua era una vía adecuada de administración de los microorganismos para el ensayo *in vivo*.

1.2 Resistencia a las condiciones gastrointestinales

Una vez elegido el sistema de administración, se probó la capacidad de resistencia de los microorganismos a las condiciones gastrointestinales de los pollos.

Dado que las cepas de *L. plantarum* y la Fracción microbiana del kefir (FMK) no son cepas nativas de las aves, se realizó un análisis de su resistencia a las condiciones gastrointestinales del pollo. La condición simulada gástrica consistió en una incubación a 41 °C, pH 2,5 durante 2 horas, mientras que la condición simulada intestinal consistió en una incubación a 41 °C, pH 8 durante 4 horas.

En la tabla 2 se muestran los recuentos iniciales de los microorganismos.

Tabla 2: Recuento de microorganismos inicial de los microorganismos en la resistencia a las condiciones gastrointestinales

Microorganismos	Recuento inicial
<i>L. plantarum</i> CIDCA 83114	$2,1 \times 10^9 \pm 1,0 \times 10^8$
<i>L. plantarum</i> CIDCA 8316	$2,9 \times 10^9 \pm 1,2 \times 10^8$
<i>L. plantarum</i> CIDCA 8329	$3,5 \times 10^9 \pm 6,7 \times 10^8$
<i>L. plantarum</i> CIDCA 4346	$2,8 \times 10^9 \pm 7,1 \times 10^8$
Bacterias Acido Lácticas (BAL) ¹	$2,5 \times 10^8 \pm 1,3 \times 10^8$
Bacterias Ácido Acéticas (BAA) ¹	$1,5 \times 10^8 \pm 1,7 \times 10^8$
Levaduras ¹	$6,2 \times 10^7 \pm 1,3 \times 10^7$

¹Comunidad de microorganismos correspondiente a la FMK

En la figura 2 se observan los resultados obtenidos.

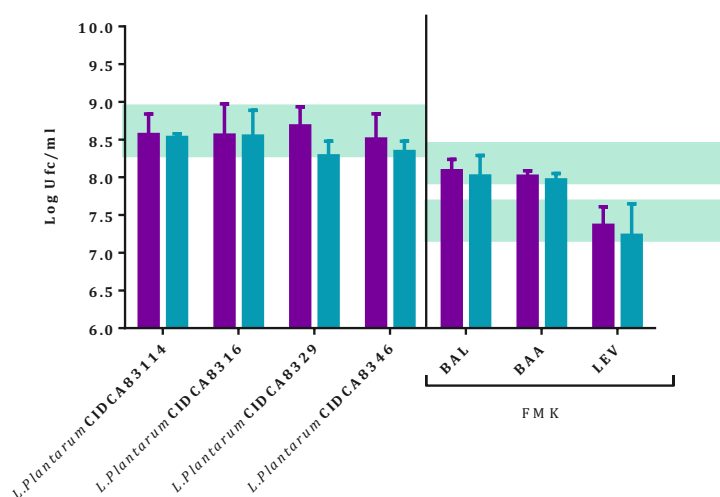


Figura 2: Resistencia a las condiciones gastrointestinales de *L. plantarum* y la FMK. : Condición simulada gástrica. : Condición simulada intestinal. **a)** Log UFC/ml del recuento inicial de *L. plantarum*; **b)** Log UFC/ml del recuento inicial de bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA) en la FMK; **c)** Log UFC/ml de recuento inicial de levaduras en la FMK. Pruebas realizadas a 41 °C (temperatura corporal del ave).

En la figura 1 se observa que no hay diferencias significativas entre los recuentos iniciales en comparación a los recuentos de microorganismos viables después del pasaje por las condiciones gastrointestinales propias de los pollos. Para el estudio *in vivo* es importante determinar si los microorganismos a suministrar son resistentes a las condiciones de sistema gástrico de las aves. Ya

que las cepas utilizadas en este estudio han sido suministradas en humanos, se sabe que resisten las condiciones GI de los mamíferos (Carasi 2008). Las condiciones de pH y temperatura corporal de las aves pueden generar cambios en la resistencia de las cepas. Estos resultados son importantes para el desarrollo posterior del estudio ya que se requiere la resistencia a las condiciones simuladas gastrointestinales del microorganismo probiótico, según los requisitos exigidos en las *Guidelines for the evaluation of probiotics in Food* (2002). Estos resultados coinciden con estudios realizados otros lactobacilos aislados de kéfir donde se demostró que resistieron a las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal de mamíferos (Bengoa et al. 2017; Carasi et al. 2014). Una de las mayores diferencias entre mamíferos y aves es la temperatura corporal, la cual es uno de los factores más importantes que afectan al crecimiento y supervivencia de los microorganismos, variando entre los diferentes géneros. Cada microorganismo tiene un rango de temperatura óptima de su hábitat natural; a medida que se eleva la temperatura, las reacciones químicas y enzimáticas son más rápidas y el crecimiento se acelera, hasta el punto en que tienen lugar las reacciones de inactivación (Madigan 2017). En este estudio las cepas resistieron los cambios de temperatura, pH y concentración de sales biliares. La tolerancia al tracto gastrointestinal pueden deberse a las diferencias existentes en la estructura de la pared celular de las distintas especies y géneros bacterianos (Quinto et al. 2014; Rondón et al. 2008). Este estudio es importante porque permite asegurar que las cepas seleccionadas en el estudio lleguen viables y en concentración suficiente una vez que han superado las barreras ácida y biliar en el tracto digestivo (Tuomola et al. 2001). Estos resultados también pueden predecir la capacidad *in vivo* de las cepas; de ahí que, el éxito de un probiótico depende en gran medida de realizar una buena selección *in vitro* (Rondón et al. 2008).

A partir de los resultados obtenidos se pudo determinar que los microorganismos seleccionados resisten las condiciones a las que serán expuestos en el experimento *in vivo*. Los experimentos siguientes consistieron en administrar los microorganismos seleccionados a los pollos parrilleros.

1.3 Evaluación de los parámetros productivos en pollos parrilleros

La determinación de los parámetros productivos constituyen los indicadores técnicos para medir la eficiencia de crecimiento de los pollos. Se realizaron dos experimentos:

Experimento (1): se evaluó el efecto del agua suplementada con el permeado de suero fermentado con *L. plantarum* CIDCA 83114 (PSF114) (conteniendo *L. plantarum* mas productos metabólicos).

Experimento (2): A fin de incluir una mayor variedad de cepas en el estudio del efecto probiótico, el agua de bebida se suplemento con *L. plantarum* CIDCA 83114, 8316,8329 8346 y la Fracción Microbiana del Kefir FMK. Se empleó solo el *pellet* microbiano sin incluir los productos metabólicos de la fermentación (PS fermentado).

En el análisis de resultados se hará referencia a cada experimento como experimento (1) o experimento (2).

En ambos experimentos se monitorearon diariamente los signos de morbi-mortalidad de los animales (mortalidad y estado de salud). Semanalmente, se registraron los parámetros productivos: peso, consumo, conversión alimenticia y factor de eficiencia productiva (FEP) por grupo de tratamiento. En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos con los parámetros productivos del experimento con PSF114 a los días 7, 14 y 21 de la crianza. Se usaron dos grupos control. Uno al que se le administró sólo agua, y un grupo al cual se le administró PS sin fermentar para determinar el efecto que pudiesen tener los compuestos del PS en la alimentación de los pollos.

Tabla 3. Parámetros productivos de pollos parrilleros que consumieron PSF114 en agua de bebida durante 21 días.

Edad (Días)	Tratamiento	Peso (g)	Consumo de alimento(g)	Conversión alimentaria (kg/kg)	Factor de eficiencia productiva
7	Agua	194,6±4,0	160,3 ±4,3	0,8 ± 0,04	356,9 ± 22,5
	PS	191,4 ±7,7	156,6 ±4,2	0,8 ± 0,02	352,2 ± 22,0
	PSF114	194,3 ±7,2	161,0± 5,03	0,8 ± 0,02	354,7 ± 21,2
14	Agua	554,9 ±20,3	596,5 ±18,0	1,1 ± 0,02	362,6 ± 17,9
	PS	549,1 ±19,9	589,0 ±26,8	1,1 ± 0,03	366,0 ± 17,9
	PSF114	562,4 ±13,8	604,7 ±8,9	1,1 ± 0,02	373,8 ± 16,5
21	Agua	1207,5 ±27,1	1394,6 ±33,5	1,2 ± 0,02	489,2 ± 31,4
	PS	1181,2±36,9	1347,9 ±61,1	1,1 ± 0,02	484,1 ± 24,3
	PSF114	1195,7 ± 31,5	1389,3 ±29,7	1,2 ± 0,02	490,2 ± 19,4

Los valores representan las medias ± (DS) de 16 animales. Valores evaluados estadísticamente, sin diferencias significativas $P > 0,05$ PS: permeado de suero. Agua: agua sin aditivos. PSF114: Consumo promedio por pollos (2×10^8 - 2×10^9 UFC/día)

En la tabla 3 se observa que no hay diferencias significativas entre el grupo que consumió PSF114, PS y agua, los resultados mostraron que el consumo no alteró significativamente los índices de rendimiento. El incremento de peso, el consumo alimentario, la conversión alimentaria y el FEP aumentaron a lo largo de tiempo tanto en los controles como en el tratamiento, mostrando un comportamiento normal de la cría.

En un segundo experimento, se suministró FMKLP. En este experimento se llevó hasta el día 28 el estudio de los parámetros productivos, a fin de administrar más microorganismos a los pollos parrilleros. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Parámetros productivos de pollos parrilleros que consumieron FMKLP durante 28 días.

Edad	Tratamiento	Peso (g)	Consumo de alimento(g)	Conversión alimentaria (kg/kg)	Factor de eficiencia productiva
7	Agua	172,6 ± 4,1	143,6 ± 3,8	0,8 ± 0,02	288,5 ± 12,3
	FMKLP	174,9 ± 10,6	149,6 ± 6,2	0,8 ± 0,03	290,0 ± 30,6
14	Agua	464,8 ± 23,6	463,9 ± 21,6	1,0 ± 0,06	327,7 ± 35,7
	FMKLP	475,7 ± 24,9	463,5 ± 25,9	1,0 ± 0,06	350,0 ± 34,8
21	Agua	893,2 ± 18,2	1081,2 ± 41,7	1,2 ± 0,03	345,4 ± 20,6
	FMKLP	879,8 ± 33,0	1088,4 ± 46,1	1,2 ± 0,07	333,7 ± 35,0
28	Agua	1494,1 ± 51,6	1847,9 ± 84,4	1,2 ± 0,03	431,6 ± 14,7
	FMKLP	1500,8 ± 50,8	1888,6 ± 40,6	1,3 ± 0,03	427,2 ± 22,7

Los valores representan las medias ± desviación estándar de 16 animales. Valores evaluados estadísticamente, sin diferencias significativas $P > 0.05$ Consumo promedio por pollo (2×10^8 - $1,7 \times 10^9$ UFC/ día)

En concordancia con los resultados mostrados en la tabla 1, en este experimento no se observaron diferencias significativas entre el grupo que consumió FMKLP y agua. Los resultados mostraron que el consumo no alteró significativamente ningún índice de rendimiento. Teóricamente se estima que los parámetros productivos deben estar enmarcados en 4 % de mortalidad para periodos de 38 a 42 días, conversión entre 1,0 a 1,9 y FEP por encima de 200 unidades (Molero et al., 2001). Por lo tanto los valores presentados en este trabajo entran en los índices productivos estimados.

Al comparar el experimento 1 (PSF114) con el experimentos 2 (FMKLP) se encontró que el Factor de Eficiencia Productiva (FEP) tuvo un mayor valor numérico, en todos los días y tratamientos, debido a que a mayor peso inicial mayor FEP y mayor conversión alimentaria (1). Los pollos comienzan con un peso mayor, esto proporciona pollos con peso final mayor. Dado que para calcular el FEP se tiene en cuenta el peso final, la edad, y la conversión alimentaria, cualquier cambio ambiental o de estrés se vería reflejado en el FEP. Dicho esto, los experimentos no presentaron diferencias en todo el proceso ya que se considera

que un proceso productivo está bien cuando está por encima de 200 unidades FEP (Díaz et al. 2007).

En conclusión, la relación de aumento en los dos experimentos es similar, las tendencias de incremento de peso, consumo y conversión son similares. El consumo de FMKLP o el consumo de PSF114 no indujeron ningún efecto perjudicial en los parámetros de rendimiento de los pollos de engorde.

Nuestros resultados estuvieron en línea con otros autores, donde no se encontraron diferencias en las variables productivas, de acuerdo con el uso de probióticos o diferentes cepas de bacterias ácido lácticas en pollos parrilleros (Olnood et al. 2015; Rocha et al. 2010; Salehimanesh et al. 2016).

Otros autores informaron que los índices de rendimiento de los pollos de engorde mejoraron mediante la adición de diferentes concentraciones de leche fermentada con kefir en el agua de bebida (Cenesiz et al. 2008; Cho et al. 2013; Toghyani et al. 2015). En estos experimentos se usó la leche fermentada con gránulos de kefir para suplementar el agua de bebida de los pollos, aportando no sólo la comunidad microbiana sino también las proteínas y grasas que aporta la leche fermentada. Al observar los resultados obtenidos por Cenesiz et al. 2008, no se observa una diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control (Agua) con relación a los parámetros productivos, los resultados de los mismos presentan escasas diferencias en los parámetros productivos entre los grupos control y tratados. Jin et al. (2000) estudiaron el efecto de la combinación de *Lactobacillus acidophilus* I26 y una mezcla de 12 lactobacilos sobre el crecimiento de pollos parrilleros, comprobando que la ganancia de peso y la eficiencia de conversión alimenticia era superior en los pollos tratados con probióticos respecto del grupo Agua. Sin embargo, cabe destacar que el uso de 12 cepas de lactobacilos para un tratamiento probiótico puede llegar a ser más costoso que las pérdidas asociadas a la mortalidad natural de los pollos del grupo no tratado, o a la ganancia de peso. Esta observación es importante y trasladada a nuestro estudio es conveniente aclarar que la FMK tiene cientos de cepas diferentes y al ser un producto natural no implica un costo excesivo.

Según lo reportado en diferentes estudios con probióticos administrados a pollos, el efecto sobre los parámetros productivos no es el único resultado que se busca. El papel principal de una dieta no es solo proporcionar suficientes nutrientes para cumplir con los requisitos metabólicos del cuerpo sino también para modular diversas funciones del cuerpo (Alkhalif & Alhaj 2010; Blajman et al. 2014). El efecto del aumento de peso, no necesariamente puede ser un efecto benéfico, ya que no existe evidencia de que el aumento de peso sea proporcional al aumento de músculo o proteína en el producto final. Este aumento puede ser tejido adiposo, que es un efecto no deseado en la carne. Por lo tanto se analizaron otros parámetros fisiológicos en los animales, para ver que otros efectos producían los microorganismos administrados.

2. Peso de hígado y análisis proximal.

Una de las consecuencias de la producción intensiva de pollos de engorde es el aumento en la grasa corporal (y sus enfermedades relacionadas). La generación excesiva de lípidos hepáticos en el pollo puede causar esteatosis y síndrome hemorrágico del hígado graso (*Fat Liver Hemorrhagic Syndrome* FLHS), que se caracteriza por obesidad, disminución aguda de la producción de huevos y muerte súbita por daño hepática y hemorragia (He et al. 2014; Liang et al. 2015; Wolford & Polin 1972). El uso de microorganismos que disminuyan la grasa hepática puede ser benéfico en la producción intensiva de pollos, ya que podría evitar la aparición de enfermedades relacionadas con la acumulación de grasa. Por esta razón se estudió peso fresco y relativo, la humedad y el porcentaje de lípidos en los hígados de los pollos. Para esto, después del sacrificio se removieron los hígados en esterilidad y se pesaron, para ser congelados hasta que se realizara el análisis de grasa y humedad. En la Tabla 3 se observan los efectos del consumo de PSF114 a nivel hepático.

Tabla 3: Peso, porcentaje de peso, humedad, grasa en el hígado de pollos que consumieron PSF114 en agua de bebida.

Día	Tratamiento	Peso hígado	% peso del hígado (p/p)	Humedad hígado (%)	Grasa hígado % BH¹	Grasa en hígado (%)BS²
7	Agua	6,2 ± 0,9	2,72 ± 0,26	75,9 ± 2,0	3,2 ± 0,7	13,3 ± 3,1
	PS	6,5 ± 0,8	3,1 ± 0,61	74,2 ± 3,0	5,2 ± 3,4	16,4 ± 4,9
	PSF114	6,8 ± 1,1	2,9 ± 0,41	75,2 ± 2,7	4,7 ± 1,9	16,7 ± 4,8
14	Agua	14,4 ± 1,4	2,72 ± 0,26	74,1 ± 1,6	3,4 ± 0,9	13,3 ± 3,3
	PS	14,9 ± 2,1	3,1 ± 0,61	74,8 ± 0,7	3,2 ± 1,0	12,5 ± 3,7
	PSF114	15,0 ± 1,8	2,9 ± 0,41	75,0 ± 1,2	3,0 ± 0,8	12,2 ± 3,2
21	Agua	28,7 ± 3,4	2,4 ± 0,32	74,7 ± 1,1	3,5 ± 0,6	14,0 ± 2,5 ^a
	PS	25,7 ± 2,6	2,3 ± 0,24	74,8 ± 1,1	3,0 ± 0,5	12,9 ± 1,9 ^a
	PSF114	25,9 ± 1,6	2,3 ± 0,12	74,2 ± 0,8	2,7 ± 0,5	10,4 ± 1,6 ^b

Los valores representan la media ± DS de 16 animales.¹Determinado en Base Húmeda (BH) siguiendo la ecuación de Mendonca y Jensen (1983).² Determinado en base al peso seco por método de extracción con solvente. ^{a, b} Los valores con diferentes superíndices en las mismas columnas para cada día son significativamente diferentes (P<0.05) para cada parámetro. Donde no hay superíndices no hay diferencias significativas.

Como se observa en la tabla 3, el porcentaje de lípidos en hígado de los pollos que consumieron PSF114 disminuyó, al día 21 con respecto al grupo Agua y al grupo que consumió PS.

Se analizó el peso, porcentaje de humedad y lípidos en hígado en los pollos del experimento 2. Las cepas que se administraron y los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Peso, porcentaje de peso, humedad y grasa en el hígado de pollos que consumieron FMKLP en agua de bebida.

Día	Tratamiento	Peso hígado	Porcentaje peso del hígado	Humedad hígado (%)	Grasa hígado% BH¹	Grasa en hígado (%)BS²
7	Agua	6,6± 1,0	3,9 ± 0,5	73,7 ± 3,9	4,5 ± 5,2	17,7 ± 5,0 ^a
	FMKLP	6,1± 1,2	4,0 ± 0,6	75,4± 1,3	2,2 ± 1,7	16,1 ± 5,1 ^a
21	Agua	22,1 ± 2,4	2,5 ± 0,3	74,7 ± 1,0	3,1 ± 1,4	12,3 ± 3,9 ^a
	FMKLP	20,8 ± 1,8	2,4 ± 0,25	75,0 ± 0,9	2,7± 1,2	9,5 ± 2,7 ^b
28	Agua	39,6 ± 3,9	2,8 ± 0,3	75,7 ± 1,4	1,9 ± 1,9	18,0 ± 6,8 ^a
	FMKLP	39,2 ± 4,3	2,8 ± 0,3	75,9± 1,2	1,6 ± 1,6	11,9 ± 3,3 ^b

Los valores representan la media ± DS de 16 animales.¹Determinado en Base Húmeda (BH) siguiendo la ecuación de Mendonca y Jensen (1983).² Determinado en base al peso seco por método de extracción con solvente.^{a, b} Los valores con diferentes superíndices en las mismas columnas para cada día son significativamente diferentes (P <0.05) para cada parámetro. Donde no hay superíndices no hay diferencias significativas.

El consumo de FMKLP en el agua de bebida disminuyó el porcentaje de lípidos, (medido por el método de extracción con solvente), a los 21 y 28 días de edad con respecto al grupo Agua. Además este tratamiento no indujo ningún cambio en el peso y la humedad en hígado. Estos resultados son similares a los obtenidos en el experimento 1, tabla 3. Los resultados obtenidos en estos experimentos en cuanto a la disminución del porcentaje de lípidos hepáticos son coincidentes con Cenesiz et al. (2008) donde los pollos de engorde que recibieron leche fermentada con kefir mostraron una concentración de lípidos y grasas totales significativamente más bajas en suero. Por lo tanto, esta disminución de los lípidos se podría atribuir a la acción de los microorganismos y no a los metabolitos que estos producen. Otro estudios han reportado que la actividad del ácido láctico, la producción de enzimas y el descenso del pH a nivel intestinal, hacen parte de la acción de las BAL para disminuir las concentraciones séricas de lípidos, reportada en modelos animales (hámsters) (Huang et al. 2015; Lin et al. 2017; Ros 2000). Este efecto se observó en este estudio dada la reducción de la grasa en el hígado al día 21 en ambos experimentos y al día 28 en el experimento 2, donde se usaron sólo los microorganismos sin incluir los metabolitos producidos. Existen varios

estudios que avalan la disminución de grasa, ya que se ha informado que los probióticos poseen hipolipidemia y propiedades hipocolesterolémicas en estudios con animales. Mohan et al. (1995) informaron que la administración de una mezcla probiótica (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum*, y *Aspergillus oryzae*) a gallinas ponedoras, redujo el colesterol en el plasma y en los huevos. Cenesiz et al. (2008) informaron que los pollos de engorde que recibieron leche fermentada con kefir tuvieron un total de lípidos y colesterol en el suero significativamente menor al determinado en los pollos control (Agua). Para analizar qué efecto tienen los tratamientos suministrados en los experimentos se evaluaron otros órganos como la bolsa de Fabricio y el bazo, los cuales son indicadores de estimulación inmunológica, ya que son órganos linfoides primarios y un aumento en el tamaño de éstos indicaría una infección o patología (García-Hernández et al. 2016). Los resultados se muestran a continuación.

3. Peso de bolsa de Fabricio y bazo.

Las bacterias probióticas, especialmente las BAL y los productos de la fermentación, originan cambios en la población microbiana intestinal y a su vez, estimulan el sistema inmune (Higgins et al. 2007). Estos estímulos de tipo inmunológico pueden verse reflejados en el aumento del peso de órganos relacionados con el sistema inmune. Por lo tanto se evaluó el peso de la bolsa de Fabricio y del bazo y la relación de estos pesos lo cual indica que puede haber una respuesta inmune exacerbada. Los datos obtenidos se presentan en la tabla 5.

Tabla 5: Peso del bazo, bolsa de Fabricio y la relación Bolsa de Fabricio/Bazo de pollos que consumieron PSF114 en agua de bebida.

Edad	Tratamiento	Peso (g)		% de Peso		Relación B. de Fabricio/ Bazo
		Bazo	B. de Fabricio	Bazo	B. de Fabricio	
7	Agua	0,22 ± 0,08	0,33 ± 0,07	0,13 ± 0,04	0,19 ± 0,05	1,7 ± 0,7
	PS	0,16 ± 0,05	0,38 ± 0,08	0,10 ± 0,03	0,22 ± 0,05	2,5 ± 0,7
	PSF114	0,18 ± 0,07	0,37 ± 0,14	0,10 ± 0,04	0,22 ± 0,08	2,2 ± 0,8
14	Agua	0,44 ± 0,12	1,27 ± 0,19	0,08 ± 0,02	0,24 ± 0,03	3,1 ± 1,1
	PS	0,49 ± 0,16	1,21 ± 0,48	0,10 ± 0,05	0,25 ± 0,09	2,9 ± 1,8
	PSF114	0,43 ± 0,14	1,25 ± 0,23	0,08 ± 0,03	0,24 ± 0,04	3,2 ± 1,1
21	Agua	0,96 ± 0,35	3,2 ± 0,8	0,08 ± 0,03	0,27 ± 0,07	4,3 ± 3,7
	PS	0,69 ± 0,56	3,6 ± 1,2	0,06 ± 0,05	0,32 ± 0,11	5,4 ± 2,1
	PSF114	0,75 ± 0,43	3,0 ± 0,6	0,06 ± 0,04	0,26 ± 0,04	4,9 ± 1,8

Los valores representan la media ± DS de 16 animales. No hay diferencias significativas entre los grupos $P > 0.05$.

El consumo de PS y PSF114 en el agua de bebida no indujo ningún cambio en el peso de hígado y el bazo de los pollos durante los días de tratamiento, tampoco hubo diferencias entre los grupos en la relación Bolsa de Fabricio/peso del bazo.

Se realizó la misma determinación en el experimentos (2), la tabla 6 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 6: Peso del bazo, bolsa de Fabricio y la relación Bolsa de Fabricio/Bazo de pollos que consumieron FMKLP en agua de bebida.

Edad	Tratamiento	Peso (g)		% de Peso		Relación Bolsa de Fabricio/ Bazo
		Bazo	Bolsa de Fabricio	Bazo	Bolsa de Fabricio	
7	Agua	0,13 ± 0,04	0,30 ± 0,07	0,08 ± 0,02	0,17 ± 0,04	2,25 ± 0,66
	FMKLP	0,15 ± 0,10	0,25 ± 0,07	0,10 ± 0,06	0,16 ± 0,04	2,14 ± 1,23
21	Agua	0,75 ± 0,18	2,11 ± 0,49	0,08 ± 0,02	0,24 ± 0,05	3,00 ± 0,95
	FMKLP	0,68 ± 0,17	1,91 ± 0,49	0,08 ± 0,02	0,23 ± 0,06	3,00 ± 1,29
28	Agua	2,01 ± 0,64	2,34 ± 0,95	0,14 ± 0,05	0,17 ± 0,07	1,20 ± 0,41
	FMKLP	1,81 ± 0,55	1,78 ± 0,91	0,13 ± 0,04	0,13 ± 0,07	1,10 ± 0,64

Los valores representan la media ± DS de 16 animales. No hay diferencias significativas $P > 0,05$.

No se observan cambios en los pesos de bolsa de Fabricio, y bazo, ni en la relación bolsa de Fabricio / peso del bazo.

En los estudios realizados, ninguno de los tratamientos tuvo impacto significativo en el peso del bazo y la bolsa de Fabricio. Estos resultados son de gran valor debido a que estos órganos son tejidos linfoides primarios y secundarios, respectivamente (Oláh et al. 2013), lo cual representa un marcador de inocuidad de los microorganismos usados, ya que no genera un estímulo inmunológico que se vea representado en el aumento de peso de dichos órganos. Esto concuerda con lo encontrado por Salarmoini y Fooladi (2011); en la administración de *Lactobacillus acidophilus*, en el agua de bebida de pollos parrilleros y no presentaron aumento de bazo, ni bolsa de Fabricio. En el caso de estudios donde se suministró kefir tampoco los órganos presentaron aumento de peso (Cho et al. 2013).

3. Translocación de microorganismos

El consumo de microorganismos probióticos puede ocasionar ciertos efectos tales como translocación a través del tejido epitelial. Estos microorganismos son capaces de sobrevivir por varios días en el bazo u otros sitios, estimulando el proceso de fagocitosis y a las células inmunocompetentes del tejido linfático asociado al intestino (Bellhorn & Macintire 2004). La translocación

ocurre cuando células viables presentes en la mucosa o el lumen intestinal penetran hasta los nódulos linfáticos mesentéricos y a otros órganos como el bazo y el hígado (Knoop et al. 2016; Tellez et al. 2015). Normalmente, la translocación se relaciona con patologías, y está definida como el paso de bacterias endógenas viables o sus productos del tracto intestinal a través de la barrera epitelial a los ganglios linfáticos mesentéricos, circulación sistémica u órganos extraintestinales. Se considera un mecanismo importante para la incidencia de infecciones, incluida la peritonitis bacteriana espontánea y sepsis en pacientes cirróticos.

En los experimentos de translocación preliminares que se describieron en Materiales y Métodos, se encontró un número de colonias bajo (<10 UFC/gr) en algunos animales de cada lote, lo que indica un posible paso de un bajo número de bacterias que no tuvo incidencia en el desarrollo de una patología, infección o daño en los tejidos, síntomas propios de la translocación. Tampoco se observó deterioro del estado general de salud de los animales. Con la técnica empleada se observaron resultados coincidentes entre los animales control y los tratados con probióticos, lo que indicaría que el probiótico no favoreció la translocación de los microorganismos al hígado y bazo. En concordancia con los análisis realizados a los órganos expuestos más arriba (Tablas: 3, 4, 5, 6), el hígado y el bazo no presentaron ninguna alteración en el peso, alteraciones inmunológicas, ya que estos órganos se ven modificados ante la presencia de patología, como el virus de Newcastle o frente la enfermedad de Gumboro (Jaimes et al. 2009). Tellez et al (2015) reportaron el efecto del tipo de alimentación en la translocación a hígado de enterobacterias en pavos, demostrando que las aves que comían maíz y centeno presentaron translocación en órdenes de 10 y 100 UFC/g respectivamente, mostrando que es muy probable que las aves presenten translocación a hígado y bazo en condiciones normales de crecimiento, aunque esta pueda ser alterada según se altere la microbiota intestinal.

4. Recuento diferencial leucocitario

El recuento diferencial leucocitario permite determinar si existe alguna alteración como procesos de infección y alteración inmunológica. Se extrajo sangre de la vena braquial y un centenar de leucocitos fueron contados diferenciándolos en granulocitos (heterófilos, eosinófilos y basófilos) y agranulocitos (linfocitos y

monocitos) con el fin de calcular su porcentaje de contenido. Además, se calculó la relación de heterófilos con los linfocitos (relación H/L). Los cambios en el porcentaje de tipos de glóbulos blancos para diferentes tratamientos se muestran en las Tablas 9 y 10.

Tabla 9: Recuento diferencial de glóbulos blancos obtenidos de los días 7,14 y 21 de edad de los pollos parrilleros que consumieron PSF114.

Edad	Tratamiento	(%) Porcentaje de Glóbulos blancos en pollos			Relación Heterófilos/ Linfocitos
		Linfocitos	Heterófilos	Monocitos	
7	Agua	84,7±2,9a	13,7 ±2,4a	1,6±0,9a	0,2 ±0,03a
	PS	84,9 ±2,4a	13,3 ±2,0a	1,8 ±0,7a	0,2±0,03a
	PSF114	85,9 ±2,1a	12,6 ±1,8a	1,5 ±0,7a	0,1±0,02a
14	Agua	84,7±5,2a	13,8±5,1a	1,5±0,7a	0,2± 0,08a
	PS	69,8±10,1b	28,4±9,9 b	1,8±0,4a	0,4± 0,2b
	PSF114	67,3±8,5b	30,1±9,0b	1,9±0,5a	0,5 ±0,2b
21	Agua	80,8±6,1a	17,0 ±6,1	2,3±0,5a	0,2 ± 0,1a
	PS	78,4±7,8a	19,1±7,9	2,5±0,7a	0,3±0,1a
	PSF114	79,2±5,3a	18,3±5,3	2,5±0,8a	0,2±0,1a

^{a, b}. Letras diferentes en un mismo día representan diferencias significativas. Datos presentados del porcentaje de 16 animales por grupo experimental

Los datos presentados muestran el recuento diferencial de glóbulos blancos en el experimento (1). Se puede observar que el consumo de agua suplementada con PSF114 y con PS disminuyó significativamente el porcentaje de linfocitos y aumentó el porcentaje de Heterófilos y heterófilos/linfocitos a los 14 días de edad, mostrando un efecto en el cambio de la alimentación de los pollos. Los linfocitos son responsables de la inmunidad específica e inician las reacciones de adaptación en las aves (Hakansson & Molin 2011). En el caso de los Heterófilos, estos juegan

un papel importante en la fase aguda de la inflamación. Su principal función es la fagocitosis; además, cuando se presenta alguna modificación o estrés en el animal se disminuyen los linfocitos, los heterófilos aumentan y como consecuencia se modifica la relación H/L (Heckert et al. 2002). Esta modificación solo se presentó al día 14, tanto para el tratamiento como el agua adicionada con PS. El día 21 los parámetros se muestran todos sin diferencias significativas con respecto al control demostrando que los pollos pudieron revertir el incremento en respuesta frente a los tratamientos.

Se realizaron los mismos análisis en el experimento (2), los datos se muestran a continuación.

Tabla10: Recuento diferencial de glóbulos blancos obtenidos de los días 7,21 y 28 de edad de los pollos parrilleros que consumieron FMKLP.

Edad	Tratamiento	Porcentaje de Glóbulos blancos en pollos			Relación Heterófilos/Linfocitos
		Linfocitos	Heterófilos	Monocitos	
7	Agua	72,1 ± 5,0	21,9 ± 4,2	4,2 ± 0,8	0,3 ± 0,1
	FMKLP	73,1 ± 5,0	22,1 ± 4,6	4,5 ± 1,0	0,3 ± 0,1
21	Agua	72,8 ± 5,7 ^a	21,6 ± 5,1 ^a	4,1 ± 1,0	0,3 ± 0,1 ^a
	FMKLP	58,6 ± 7,4 ^b	34,8 ± 6,9 ^b	4,3 ± 0,7	0,6 ± 0,2 ^b
28	Agua	66,1 ± 5,0	26,4 ± 8,0	4,7 ± 4,0	0,4 ± 0,2
	FMKLP	65,2 ± 6,7	26,9 ± 6,4	5,4 ± 1,0	0,4 ± 0,2

Los valores representan la media ± DS de 16 animales. No se encontraron diferencias significativas, salvo donde se indica con diferentes letras P^(a, b)

El consumo de agua suplementada con FMKLP disminuyó significativamente el porcentaje de linfocitos y aumentó el porcentaje de heterófilos y la relación heterófilos/linfocitos a los 21 días de edad, y aumentó el porcentaje de monocitos a los 28 días de edad.

Los heterófilos y linfocitos fueron las células granulocíticas y mononucleares encontradas con mayor frecuencia en los frotis para los grupos control (Agua) y FMKLP en nuestro estudio, respectivamente. Otros autores informaron la misma tendencia en gallinas ponedoras, pollos de engorde y pollos

silvestres, cuando se suministró ácido ascórbico como suplemento alimentario. Se encontró que un aumento en la relación heterófilo/linfocitos indicaría que un cambio en la dieta de los animales alerta al sistema inmune y se puede considerar inicialmente como un cuadro de estrés (Orawan & Aengwanich 2007; Simaraks et al. 2004). Es normal que el suministro de un probiótico, debido a que es un microorganismo diferente a la microbiota del ave, genere una alerta sobre el sistema inmune, que se revierte en el día 28 cuando la relación Heterófilos/linfocitos se normaliza con respecto al grupo control. Otros estudios han demostrado que los probióticos tienen capacidad de activación de sistema inmunológico. El consumo de leche fermentada con kefir en ratones C57, disminuyó la concentración de IL-12, aumentó el recuento de células IgA⁺ en intestino, y la concentración de TNF- α en los animales tratados con kefir, concluyendo que el kefir estaría regulando la respuesta del epitelio frente a una posible patología (Correa-Franco et al. 2013).

Se ha reportado que una inhibición o disminución en la expresión de IL-12 protege al huésped de la inmunopatología y la muerte causada por una respuesta inmune celular exacerbada, como la que puede ocurrir durante infecciones microbianas agudas (Sanchez-Torres et al. 2001). En estudios realizados en ratones a los que se les administró leche fermentada con kefir, encontraron un estímulo en diversos marcadores de inmunidad como aumento de las células IgA⁺ y aumento de la actividad de macrófagos (Perdigón et al. 2001; Vinderola et al. 2005). Lo que confirmaría que el consumo de probióticos tiene estímulo inmunológico en los animales que lo consumen.

5. Parámetros bioquímicos

En general, el examen de sangre se realiza como un procedimiento de evaluación para evaluar la salud general de los individuos (Simaraks et al. 2004). En el suero se determinaron proteínas totales (TP), albúmina (Alb), urea y creatinina. Se calculó la fracción total de globulina (Glob), restando la albúmina de la proteína total, y la relación de Alb/Glob. También se determinaron los niveles de aspartatoaminotransferasa (AST), alanino-aminotransferasa (ALT), la gamma-glutamilttransferasa (GGT)

Los parámetros bioquímicos para los animales del experimento (1) se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Parámetros bioquímicos de los sueros obtenidos de los días 7,14 y 21 de edad de los pollos parrilleros tratados con PSF114.

Análisis bioquímico de suero Día 7			
	Agua	PS	PSF114
Proteínastotales (g/dl)	3,3 ±0,7 ^a	3,2 ±0,9 ^a	3,6 ±0,7 ^a
Albúmina (g/dl)	1,1 ±0,3 ^a	1,3 ±0,4 ^a	1,4 ±0,3 ^a
Globulina (g/dl)	2,2 ±0,7 ^a	1,9 ±0,7 ^a	2,2 ±0,7 ^a
Urea (g/L)	0,1 ±0,1 ^a	0,1 ±0,05 ^a	0,1 ±0,04 ^a
Creatinina (mg/L)	6,5 ±5,3 ^a	8,5 ±3,8 ^a	6,9 ±3,8 ^a
GOT (UI/l)	221,7 ±58,1 ^a	203,9 ±49,4 ^a	198,5 ±64,5 ^a
GPT (UI/l)	15,5 ±1,2 ^a	14,7 ±1,4 ^a	16,8 ±3,5 ^a
GGT (UI/l)	22,5 ±4,4 ^a	19,03 ±6,1 ^a	16,3 ±6,3 ^a
Análisis bioquímico de suero Día 14			
	Agua	PS	PSF114
Proteínastotales (g/dl)	2,3 ±0,6 ^a	2,7 ±0,5 ^a	2,9 ±0,8 ^a
Albúmina (g/dl)	1,3 ±0,3 ^a	1,8 ±0,4 ^a	1,9 ±0,6 ^a
Globulina (g/dl)	0,9 ±0,7 ^a	1,1 ±0,5 ^a	1,0 ±0,6 ^a
Urea (g/L)	0,04 ±0,02 ^a	0,04 ±0,02 ^a	0,05 ±0,05 ^a
Creatinina (mg/L)	4,2 ±1,9 ^a	4,3 ±1,8 ^a	5,3 ±1,9 ^a
GOT (UI/l)	170,3±31,9 ^a	197,3 ±46,1 ^a	190,7 ±63,2 ^a
GPT (UI/l)	13,9 ±0,6 ^a	13,9 ±0,7 ^a	14,3 ±1,2 ^a
GGT (UI/l)	16,2 ±8,5 ^a	16,1 ±7,4 ^a	16,1 ±7,7 ^a

Análisis bioquímico de suero Día 21

	Agua	PS	PSF114
Proteínastotales (g/dl)	2,7±0,4 ^a	2,8 ±0,5 ^a	3,0±0,3 ^b
Albúmina (g/dl)	1,3±0,2 ^a	1,3±0,2 ^a	1,3±0,2 ^a
Globulina (g/dl)	1,4±0,4 ^a	1,5±0,5 ^a	1,7±0,40 ^a
Urea (g/L)	0,04±0,02 ^a	0,05±0,02 ^a	0,05±0,02 ^a
Creatinina (mg/L)	7,9±3,1 ^a	7,8±2,7 ^a	9,0±4,0 ^a
GOT (UI/l)	226,5±63,8 ^a	195,12±41,9 ^a	213,4±56,0 ^a
GPT (UI/l)	17,4±3,2 ^a	15,8±3,1 ^a	15,8±3,2 ^a
GGT (UI/l)	10,3±6,3 ^a	22,4±15,9 ^a	20,5±3,9 ^a

Los valores representan la media ± DS de 16 animales. No se encontraron diferencias significativas (p≤0,05).

La administración de PSF114 y el PS no produjo cambios en los parámetros bioquímicos en los animales evaluados.

Los cambios en los parámetros bioquímicos para diferentes tratamientos se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: Parámetros bioquímicos de los sueros obtenidos de los días 7, 21 y 28 de edad de los pollos parrilleros tratados con FMKLP.

Edad		7	
Parámetro	Agua	FMKLP	
Proteínas totales (g/dl)	2,5 ± 0,5 ^a	3,1 ± 0,4 ^a	
Albumina (g/dl)	1,2 ± 0,4 ^a	0,9 ± 0,3 ^a	
Globulina (g/dl)	1,2 ± 0,3 ^a	2,1 ± 0,4 ^b	
Relación Albumina/Globulina	0,5 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,1 ^b	
Urea (mg/dl)	7,8 ± 2,0 ^a	5,4 ± 3,3 ^a	
Creatinina (mg/dl)	0,4 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	
Aspartato aminotransferasa(UI/L)	209,0 ± 39,3 ^a	173,8 ± 32,9 ^b	
Alanina aminotransferasa(UI/L)	14,5 ± 1,5 ^a	13,2 ± 0,3 ^a	
Gamma glutamiltransferasa(UI/L)	8,6 ± 3,2 ^a	10,4 ± 4,0 ^a	
Edad		21	
Parámetro	AGUA	FMKLP	
Proteínas totales (g/dl)	2,5 ± 0,4 ^a	2,7 ± 0,6 ^a	
Albumina (g/dl)	1,5 ± 0,4 ^a	1,6 ± 0,3 ^a	
Globulina (g/dl)	1,0 ± 0,5 ^a	1,4 ± 0,6 ^b	
Relación Albumina/Globulina	0,6 ± 0,2 ^a	0,5 ± 0,2 ^a	
Urea (mg/dl)	8,1 ± 7,2 ^a	8,1 ± 8,0 ^a	
Creatinina (mg/dl)	0,7 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,1 ^a	
Aspartato aminotransferasa(UI/L)	194,2 ± 45,4 ^a	175,3 ± 58,2 ^a	
Alaninaaminotransferasa(UI/L)	13,9 ± 1,00 ^a	13,8 ± 1,5 ^a	
Gamma glutamiltransferasa(UI/L)	8,4 ± 2,3 ^a	11,3 ± 2,9 ^a	
Edad		28	
Parámetro	AGUA	FMKLP	
Proteínas totales (g/dl)	3,3 ± 1,1 ^a	3,3 ± 0,6 ^a	
Albumina (g/dl)	1,5 ± 0,7 ^a	1,5 ± 0,5 ^a	
Globulina (g/dl)	1,8 ± 0,8 ^a	1,8 ± 0,6 ^a	
Relación Albumina/Globulina	0,5 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,1 ^a	
Urea (mg/dl)	8,8 ± 6,3 ^a	8,3 ± 5,0 ^a	

Creatinina (mg/dl)	0,6 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,1 ^a
Aspartato aminotransferasa(UI/L)	196,1 ± 68,7 ^a	214,1 ± 66,7 ^a
Alaninaaminotransferasa(UI/L)	15,7 ± 3,2 ^a	16,3 ± 3,2 ^a
Gamma glutamiltransferasa(UI/L)	5,4 ± 4,4 ^a	5,5 ± 5,8 ^a

Los valores representan de la media ± DS de 16 animales. No se encontraron diferencias significativas, salvo donde se indica con diferentes letras ^(a, b)

Comparado con el control, el tratamiento FMKLP, aumentó el nivel de proteína total, la cual se utiliza para evaluar el estado nutricional, la cual puede elevarse en enfermedad hepática crónica, o puede estar disminuida en casos de gastroenteropatías (por pérdida) y malnutrición (Hasan et al. 2015). En el presente estudio, no se observaron cambios o disminución en los niveles de creatinina y urea en respuesta al tratamiento con FMKLP. Por otro lado, la creatinina y la urea en plasma son las pruebas más utilizadas para diagnosticar y controlar la enfermedad renal en patología clínica humana y animal. Estas moléculas se eliminan casi por completo mediante filtración glomerular, de modo que en el caso de la insuficiencia renal su concentración plasmática aumenta (Braun & Lefebvre 2008; Fernández et al. 1994; Lopez-Giacoman & Madero 2015). La creatinina es un metabolito endógeno que proviene del metabolismo muscular y su eliminación o excreción es muy constante. La urea es el principal producto nitrogenado del catabolismo de las proteínas y es menos específica que la creatinina; y su concentración varía fisiológicamente de acuerdo al consumo de proteínas de la dieta, estado de hidratación. Por lo tanto ambas determinaciones se pueden elevar en daños renales (Del Bianchi et al. 2005; Hashem & Mohamed 2009).

El hígado tiene un papel esencial en el metabolismo de los nutrientes; en desintoxicación y excreción de metabolitos hidrófobos y xenobióticos; en la síntesis de la mayoría de las proteínas plasmáticas; y en la digestión a través de la síntesis, la secreción biliar y la conservación de los ácidos biliares que son esenciales tanto para la digestión como para la absorción intestinal de grasas y otros lípidos, incluidas las vitaminas liposolubles (Tennant & Center, 2008). La presencia de enfermedad hepática a menudo se reconoce en base a actividades séricas elevadas de enzimas de origen hepático, p. ej., AST, ALT y GGT (Tennant & Center, 2008). AST, ALT, globulina y albúmina dan una idea del daño hepático;

con valores aumentados posiblemente hay algún daño (Gowda et al., 2009). El tratamiento con MFKLP no produjo una disminución significativa o ningún cambio en las actividades de estas enzimas durante el experimento, a excepción de la GGT a los 21 días de edad. Cenesiz et al (2008) informaron resultados similares para AST sérica y ALT. Además, la enfermedad hepatocelular causa una disminución en la proteína sérica porque el hígado es el sitio exclusivo de la síntesis de albúmina, la proteína plasmática más abundante (Tennant & Center 2008). Esto no se observó en la mayoría de los ensayos de nuestro estudio.

Al encontrar los valores normalizados frente a los tratamientos realizados, se pudo concluir que los pollos no presentaron ningún tipo de patología o efecto sistémico que pudiera evidenciarse en el suero. Lo anterior demostró que la administración del probióticos fuer inocuo para las aves.

6. Análisis histopatológico de hígado y duodeno

Para comparar el estado final del tejido hepático y la mucosa del duodeno se realizaron cortes histológicos de ambos tejidos.

Se determinó el daño del tejido hepático e infiltraciones; y la longitud de la vellosidad, la profundidad de la cripta y relación cripta vellosidad en duodeno. En la figura 3 se observan cortes histológicos de hígados de pollos que consumieron agua y pollos que consumieron FMKLP tratados al día 21.

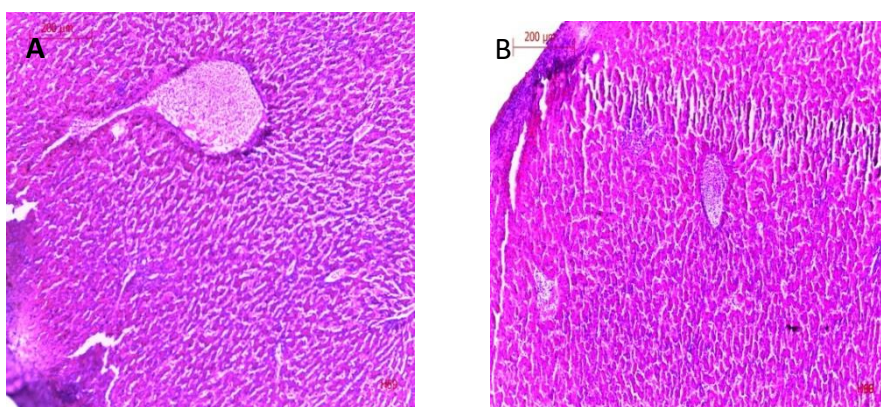


Figura 3: Histología de hígado HE, A) Agua B) FMKLP. Visto a 40x.

En la figura 3 se ven los cortes histológicos de los hígados de dos pollos del experimento (2) donde se suministró FMKLP en el agua de bebida. Estos

resultados coinciden los bajos niveles de translocación. Al observar el tejido hepático se encontró que se encuentra sano, no presenta alteraciones, ni edemas o infiltrados celulares. La presencia de microorganismos patógenos o la intoxicación crónica puede presentar serias alteraciones en el tejido, mostrando una desorganización de la estructura (Abdel-Moneim et al. 2013).

Se realizaron también cortes histológicos del duodeno de los pollos en los dos experimentos realizados. La figura 4 muestra las fotografías del experimento (1).

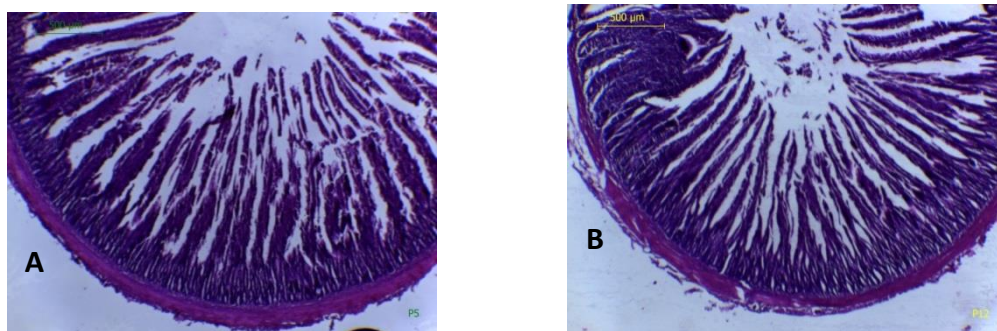


Figura 4: Histología de duodeno HE, A) Agua B) FMKLP. Visto a 10x.

En la figura 4 se ven las fotografías de los cortes histológicos obtenidos en el experimento (2) en el cual se observan en 4A el control y en 4B el corte histológico del duodeno. No se observaron diferencias en los tejidos en la observación microscópica. Se midieron las criptas y las vellosidades, además se calculó la relación vellosidad/cripta. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 13.

Tabla 13: Efecto de la administración de agua suplementada con FMKLP en la morfología del duodeno.

Día	Tratamiento	Longitud vellosidad (μm)	Profundidad cripta (μm)	Relación Vellosidad/cripta
21	Agua	1391,5 ± 115,5 ^a	469,0 ± 57,4 ^a	3,01 ± 0,5 ^a
	FMKLP	1415,3 ± 107,8 ^b	328,6 ± 32,2 ^b	4,3 ± 0,6 ^b
28	Agua	1849,8 ± 269,6 ^a	562,9 ± 92,5 ^a	3,42 ± 0,98 ^a
	FMKLP	1966,1 ± 206,1 ^b	386,8 ± 63,5 ^b	5,2 ± 1,1 ^b

Los valores representan la media ± DS de 16 animales. No se encontraron diferencias significativas, salvo donde se indica con diferentes letras ^(a,b) P<0.05

En la tabla 13 se puede observar que el grupo tratado con FMKLP presentó un aumento en la relación cripta vellosidad los días 21 y 28. Los mismos datos fueron medidos en el experimento (1) y no se encontraron diferencias significativas (datos no mostrados). El aumento de la altura de las vellosidades por los probióticos es beneficioso para los pollos de engorde ya que el área de superficie aumentada de las vellosidades mejora la absorción de nutrientes (Caspary 1992; Zachos 2016). Por otro lado, la profundidad de la cripta promovida en presencia de probióticos permite una mayor tasa de renovación del tejido de las vellosidades y repone las vellosidades que pueden perderse debido al desprendimiento o inflamación en respuesta a la infección por un patógeno (Kim et al. 2012; Wegener 2003). Se ha asociado una mayor productividad de pollos suplementados con probióticos a una mayor altura de las vellosidades intestinales. El incremento de la función absorbente puede atribuirse al aumento de la superficie de absorción, de la expresión de enzimas del borde en cepillo y de los sistemas de transporte de nutrientes (Kim et al. 2012).

7. Análisis de diversidad microbiana mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

La electroforesis en gel con gradiente desnaturizante es un método semicualitativo que se utiliza para detectar microorganismos no cultivables, comparar la diversidad de comunidades microbianas y monitorear la dinámica poblacional. Se basa en la separación electroforética de fragmentos de ADN amplificados por PCR (amplicones). Los amplicones resultantes poseen secuencias específicas de igual longitud que son separados en una matriz de poliacrilamida que contiene un gradiente desnaturizante de urea y formamida (electroforesis en gel con gradiente desnaturizante químico (DGGE)).

En este trabajo se utilizó ésta técnica para hacer el análisis de la diversidad microbiana del contenido cecal de los pollos que consumieron FMKLP y los pollos control pertenecientes al experimento (2). Con este fin se realizó la extracción de ADN de las muestras obtenidas de pollos sacrificados los días 21 y 28. Para la amplificación del ADN se utilizaron oligonucleótidos específicos para Eubacterias (518R y 341F-GC) que codifican para la región V3 del ARNr 16S.

En la figura 5 se pueden observar los perfiles electroforéticos y dendogramas obtenidos a partir del análisis de resultados.

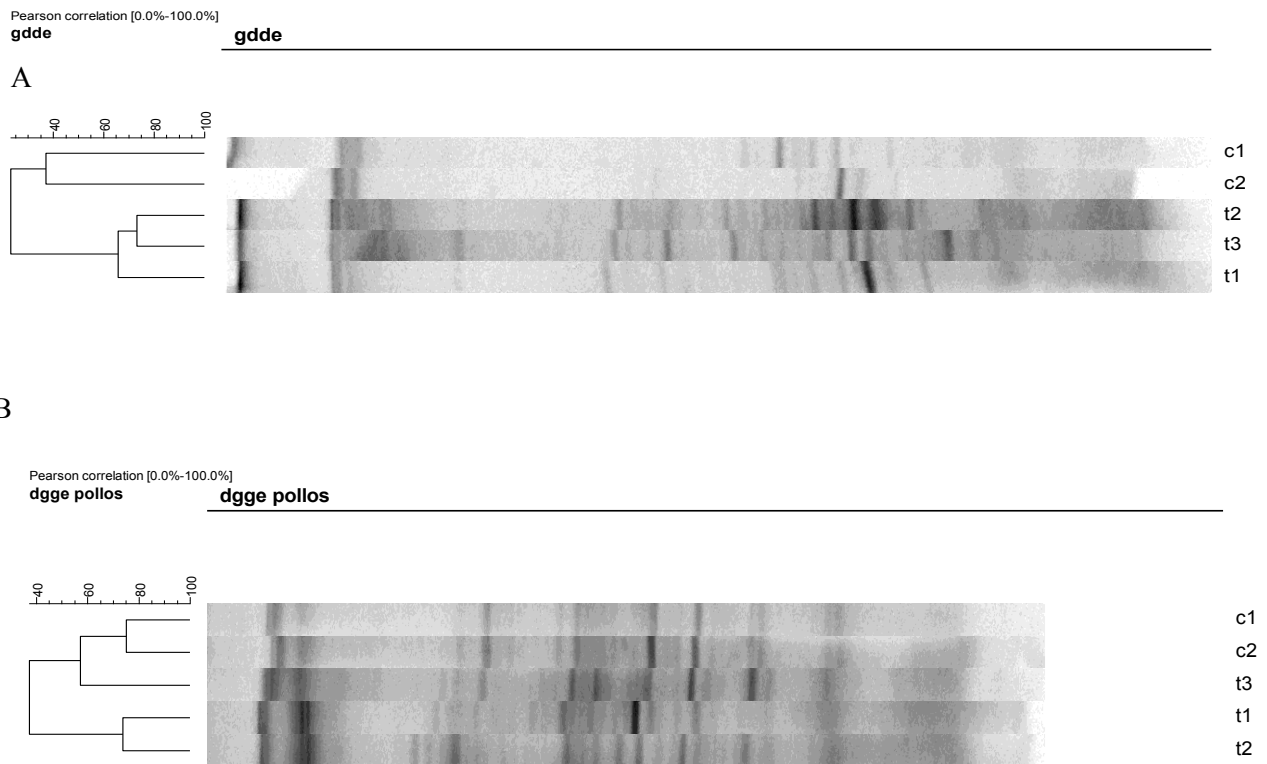


Figura 5: Perfiles DGGE, en gradiente desnaturalizante 40-60%, de productos de la amplificación de ADN extraído de muestras de materia fecal de los pollos FMKLP tomadas los días 21 y 28 de tratamiento. Para la amplificación se utilizaron los oligonucleótidos 518R y 341F-GC. Cada figura muestra los dendogramas obtenidos a partir del análisis de cada perfil. A) perfil electroforético en el día 21 B) perfil electroforético en el día 28 Contenido cecal C1 y C2 de pollos del grupo Agua, T1, T2, contenido cecal T3 de pollos del FMKLP.

Se evaluó la similitud existente entre los perfiles electroforéticos mediante el coeficiente de Jaccard y se realizó un análisis de cluster mediante el método de agrupamiento de ligamiento promedio no ponderado (UPGMA). El análisis de cluster de las muestras del día 21 se presenta en la figura 5A. Del análisis de cluster puede decirse que los aislados forman dos grandes grupos que presentan una muy baja homología (La mayoría de los perfiles agruparon con una similitud de 20 %), evidenciándose la formación de 2 clúster bien definidos. Uno de los grupos está constituido por los perfiles representativos de la microbiota de pollos que recibieron una dieta suplementada con MFKLP durante 21 días y el otro grupo está

formado por los perfiles de la microbiota de los pollos pertenecientes al grupo control. Se puede destacar que las muestras agrupan según hayan recibido o no la ingesta de MFKLP, indicando qué, a pesar de la variabilidad propia de la microbiota de cada pollo, la ingesta de suplementación con MFKLp estaría induciendo a los 21 días de tratamiento cambios que se evidencian en los perfiles DGGE.

En cuanto al análisis de clúster de las muestras del día 28, que se presenta en la figura 5B, podemos ver que todas las muestras presentan un 40% de similitud y se separan en dos subclúster bien definidos. El subclúster 1 agrupa a los pollos control, que a su vez presentan alta homología entre sí, y el pollo t3, que recibió una dieta suplementada durante 28 días; esto puede deberse a la variabilidad en la microbiota intestinal propia de cada pollo. El subclúster 2 agrupa a pollos que recibieron suplementación en el agua de bebida. Cabe destacar que, a pesar de la variabilidad existente entre los individuos de un mismo grupo, la ingesta de FMKLP produce un cambio en los perfiles electroforético sobre todo en los pollos que consumieron FMKLP durante 28 días (esto se evidencia tanto en el aumento del número de bandas como en la similitud de los perfiles).

Tabla 14: Numero de bandas obtenidas en cada muestra

Bandas	día 21	bandas	día 28
Agua (c1)	7	AGUA (c1)	12
Agua(c2)	6	AGUA (c2)	10
MFKLp (t1)	12	MFKLp (t1)	20
MFKLp(t2)	14	MFKLp(t2)	22
MFKLp(t3)	15	MFKLp(t3)	19

Datos obtenidos de las muestras de 2 pollos del grupo AGUA (consumieron agua sin suplementar) y 3 pollos del grupo tratado con probióticos.

Se realizó una comparación y análisis del número de bandas presentes en los perfiles electroforéticos de los amplicones (tabla 14) obtenidos a partir de las muestras tomadas los días 21 y 28. Se observó que es mayor el día 28 respecto al día 21. Además, tanto en el día 21 como en el día 28 se duplica el número de bandas presentes en los perfiles electroforéticos obtenidos a partir de muestras tomadas de animales control en relación al número de bandas presentes en los

perfiles electroforéticos obtenidos a partir de muestras de animales tratados con MFKLp. Es importante decir que los microorganismos que se administran estuvieron en un orden de 10^8 UFC/ml, este orden no es significativo en relación al contenido total de microorganismos en el intestino de las aves (10^{11} UFC/g). Esta modificación se podría interpretar como una estimulación de poblaciones de microorganismos ya presentes en el intestino del pollo.

El número de bandas de los perfiles no es indicativo de la cantidad de especies que están presente en cada comunidad debida a que una especie puede presentar más de una banda en su perfil electroforético (Cocolin et al., 2001; Rosado et al., 1998; Salles et al., 2001). Además está descrito que especies que representan menos del 1 % del total de una comunidad bacteriana pueden no ser visibles en los respectivos perfiles DGGE (Heuer & Smalla, 1997; Muyzer et al., 1993). Además, bajos rendimientos en la extracción del ADN debido a problemas en la lisis, amplificaciones diferenciales de genomas con bajo contenido de G-C, accesibilidad diferencial a los genes de interés dentro del genoma, interferencia de secuencias adyacentes y afinidad selectiva de los oligonucleótidos sintéticos por la secuencia blanco (Farrelly et al., 1995; Hansen et al., 1998; Kanagawa, 2003; Suzuki & Giovannoni, 1996) son otros factores que pueden influir en los resultados obtenidos por esta metodología. Sin embargo, la contrastación y análisis de los perfiles electroforéticos permite comparar comunidades. Las modificaciones en la microbiota cecal en el presente trabajo por la administración FMKLP no pudieron asociarse a una mejoría en los parámetros productivos de las aves. Si bien la microbiota tiene un rol importante en la adsorción y digestión de nutrientes, una microbiota gastrointestinal bien equilibrada es crucial para la salud y el rendimiento óptimo de los animales. El tracto gastrointestinal también sirve como una barrera vital que impide la entrada de patógenos potencialmente dañinos y otros antígenos ambientales (Dunkley et al. 2009; Rinttilä & Apajalahti 2013; Wu et al. 2014). En concordancia con este estudio, Londero (2012) suministró a pollos suero fermentado con gránulos CIDCA AGK10, encontró que en el análisis de la microbiota cecal por DGGE, una variación y aumento de poblaciones microbianas en los animales tratados. Otros autores realizaron el mismo estudio en pollos que recibieron cepas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* y *Pediococcus* y

encontraron que la administración de probióticos a pollos de engorde, logró modular la composición de la microbiota cecal y las actividades metabólicas (Frizzo et al. 2011; Oakley et al. 2014; Rinttilä & Apajalahti 2013). De manera similar a lo observado en el presente estudio Yaman et al. (2006), demostraron que la administración de kefir en dilución 0.2 y 0.5 % en agua de bebida afecta el balance de la microbiota intestinal de gansos. Estos autores hallaron una disminución en la concentración de bacterias aeróbicas totales y coliformes y un aumento de la concentración de lactobacilos en heces durante la administración del probiótico. Sin bien estos cambios se asociaron a una mejoría en el rendimiento productivo de las aves, las diferencias tampoco fueron significativas ($P > 0.05$).

En las crianzas intensivas, la posibilidad de adquirir la microbiota autóctona natural está fuertemente disminuida, ya que el pollo eclosiona en un ambiente controlado y estéril, y en ningún momento tiene contacto con la madre (Rinttilä & Apajalahti 2013). Esto conduce a que el intestino sea fácilmente colonizado por patógenos, entre los que sobresalen *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., que pueden desencadenar respuestas inflamatorias, producir infecciones localizadas o sistémicas, o sintetizar toxinas o compuestos perjudiciales (Londero et al. 2015; Panda et al. 2001). Si consideramos las importantes pérdidas económicas que originan estos agentes patógenos en las explotaciones aviares, es evidente el interés que puede suscitar la manipulación de la microbiota intestinal como una estrategia para prevenir la colonización de enteropatógenos, así como para promover la salud y el rendimiento productivo de los pollos parrilleros (Chambers & Gong 2011). Por lo tanto, el aumento de la variabilidad de la microbiota intestinal del pollo puede suponer un beneficio neto en el proceso de administración de las cepas probióticas en el agua de bebida.

Conclusiones

- ❖ *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, 8316, 8329, 8349 y la fracción microbiana del granulo CIDCA AGK1 resistieron las condiciones de cloración del agua y las condiciones gastrointestinales de aves, permitiendo su administración en el agua de bebida de pollos parrilleros.
- ❖ La administración de los tratamientos: permeado de suero fermentado con *L. plantarum* CIDCA 83114 o *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, 8316, 8329, 8349 (poolLp) más la fracción microbiana del granulo CIDCA AGK1, no generaron alteraciones en los parámetros productivos, ni en los signos de morbi-mortalidad de los pollos parrilleros.
- ❖ Los pollos a los que se les administró PSF114 y FMKLP en el agua de bebida no presentaron ninguna alteración fisiológica, manifestada en los parámetros bioquímicos, recuento diferencial leucocitario, o peso de los órganos.
- ❖ La administración de PSF114 y FMKLP disminuyó el porcentaje de grasa en hígado, en los días 21 y 28, demostrando un efecto benéfico en la administración del probiótico.
- ❖ La administración de FMKLP aumentó la variabilidad de la microbiota cecal determinada.
- ❖ La administración de probióticos provenientes del kefir en el agua de bebida de pollos parrilleros, no genera variación con relación a los controles o presenta mejoramiento de algunos parámetros.

Conclusiones Generales

A lo largo de los años las producciones avícolas han sido modificadas y han evolucionado. Si bien mejoraron los sistemas productivos, esto ha conllevado a nuevos desafíos. Los sistemas de producción intensivos y el uso de antibióticos promotores de crecimiento generaron otro tipo de problemas microbiológicos de alto impacto industrial. Por lo tanto aparecen diferentes formas de controlar los efectos adversos que traen las contaminaciones microbiológicas. Uno de los métodos más estudiados en la actualidad es el uso de microorganismos, no solo como biocontrol, sino como aditivos alimentarios. Para una aplicación eficaz de microorganismos como aditivos en la alimentación animal, las cepas probióticas deben cumplir varios criterios. En este sentido, los probióticos: i) no deben ser patógenos ni tóxicos, ii) deben producir efectos beneficiosos para el huésped después del consumo, iii) deben poseer una elevada estabilidad en presencia de jugos gástricos y la bilis iv) deben ser producidos a escala industrial, v) deben ser capaces de producir grandes cantidades de sustancias antimicrobianas y enzimas, vi) deben ser estables durante la preparación y el almacenamiento del alimento que los contiene, y vii) deben tener acción antagónica contra patógenos.

En la primera etapa del trabajo, se seleccionaron las cepas con la que se trabajaría en el transcurso de la investigación. Se probó la capacidad que tenían las cepas de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, 8316, 8329, 8346 y el granulo CIDCA AGK1 de crecer en el permeado de suero. Además tanto la cepas de *L. plantarum* como el gránulo CIDCA AGK1 tuvieron la capacidad de producir ácidos orgánicos en el PS, produciendo ácido láctico, en mayor proporción, seguido de ácido acético y ácido propiónico. La capacidad de los microorganismos de descender el pH en el proceso de fermentación, permitió una mayor concentración de ácidos orgánicos no disociados, confiriéndole un potencial antimicrobiano al PS fermentado.

Por otra parte, se seleccionaron hongos filamentosos aislados del ambiente, alimentos y agua de bebida de pollos parrilleros. Estos mismos fueron identificados a nivel de especie, por método moleculares. Los hongos fueron identificados a nivel de especie. Fueron cuatro *Aspergillus fumigatus*, un *Aspergillus terreus* y un *Aspergillus*

minisclerotigenes, estos hongos son de alto riesgo para la salud tanto de los operarios como para los pollos.

En un desafío en el que se co-cultivan los hongos y las bacterias quedo demostrado que este contacto inhibió el crecimiento del hongo, por lo tanto se demostró que *L. plantarum* tienen capacidad antifúngica.

Posteriormente se evaluó la actividad antifúngica del SLC de los PS fermentados con las cepas *L. plantarum* y el granulo CIDCA AGK1. Se encontró que todos los SLC tienen capacidad de reducir la germinación de los conidios de los hongos seleccionados. Sumado a esto se comprobó que estos mismos SLC, tiene capacidad de aumentar el tiempo de latencia y disminuir la velocidad de crecimiento de los hongos en un medio sólido. La actividad antifúngica propia de los SLC provenientes de la fermentación de PS con las cepas *L. plantarum* y gránulo CIDCA AGK1, tiene una correlación directa con la concentración de ácidos no disociados. Es importante destacar que la mayor concentración de ácidos no disociados y concomitante capacidad antifúngica la presentó el SLC de PS fermentado con el gránulo de kefir, concluyendo que al ser una comunidad más compleja, puede producir una alta concentración de ácidos, debido a su capacidad de descender el pH.

El estudio *in vitro* se complementó con el uso de la línea celular HepG2, donde se corroboró que la aflatoxina B₁ tiene un efecto citotóxico sobre éstas, y que las cepas de *L. plantarum* y la FMK tienen capacidad de contrarrestar estos efectos.

Finalmente en las pruebas *in vitro* se comprobó que *L. plantarum* CIDCA 83114, 8316, 8329 y la FMK tienen capacidad de captura de AFB₁, la cual disminuye en relación al aumento de la concentración de AFB₁ en la solución.

En una tercera etapa del trabajo, las cepas y el producto fermentado fueron suministrados a pollos parrilleros en el agua de bebida, sin modificar la composición del alimento suministrado a los animales. Durante esta etapa se comprobó que la suplementación con LPF114 o FMKLP no fueron perjudiciales a la salud y desarrollo de los animales, que presentaron los índices productivos similares a los animales

control. Como resultado adicional se encontró que el consumo de los probióticos suministrados tuvo capacidad para disminuir la grasa en el hígado y aumentar la variabilidad de la microbiota intestinal, viéndose esto como un efecto positivo en el desarrollo de los animales.

La fermentación de un subproducto de la industria láctea como es el PS, presenta una ventaja a nivel económico y productivo por su bajo costo. Permitiendo concluir que es un producto al que pueden acceder pequeños y medianos productores.

Referencias Bibliográficas

- Abarca, M. L. (2000) Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial, *Revista Iberoamericana de Micología*, 19, pp. s79–s84.
- Abbas, H. K., Zablotowicz, R. M., Bruns, H. A. & Abel, C. A. (2006) Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates, *Biocontrol Science & Technology*, 16(5), pp. 437–449.
- Abdel-Moneim, A. M., Essawy, A. E., Badr El-Din, N. K. & El-Naggar, N. M. (2013) Biochemical and histopathological changes in liver of the Nile tilapia from Egyptian polluted lakes, *Toxicology and Industrial Health*, 32, pp. 457–467.
- Acosta, A., Lon-Wo, E., Garcia, Y., Dieppa, O., & Febles, M. (2007). Effect of a probiotic mixture (*Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*) on the productive performance, carcass yield and economic indicators of broiler chickens. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 41(4), pp 335-338.
- Adedara, I. A., Owumi, S. E., Uwaifo, A. O. & Farombi, E. O. (2010) Aflatoxin B₁ and ethanol co-exposure induces hepatic oxidative damage in mice, *Toxicology and Industrial Health*, 26(10), pp. 717–724.
- Ahlberg, S. H., Joutsjoki, V. & Korhonen, H. J. (2015) Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation, *International Journal of Food Microbiology*, 207, pp. 87–102.
- Akande, K. E., Abubakar, M. M., Adegbola, T. A. & Bogoro, S. E. (2006) Nutritional and health implications of mycotoxins in animal feeds: A review, *Pakistan Journal of Nutrition*, pp. 398–403.
- Alaniz Zanon, M. S., Barros, G. G. & Chulze, S. N. (2016) Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents to reduce aflatoxin contamination in peanuts harvested in Northern Argentina, *International Journal of Food Microbiology*, 231, pp. 63–68.
- Alkhalf, A. & Alhaj, M. (2010) Influence of probiotic supplementation on blood parameters and growth performance in broiler chickens, *Saudi Journal of Biological Sciences*. 17(3), pp. 219–225.
- Andretta, I., Kipper, M., Lehnen, C. R. & Lovatto, P. A. (2012) Meta-analysis of the relationship of mycotoxins with biochemical and hematological parameters in broilers, *Poultry Science*, 91(2), pp. 376–82.
- Apar, D. K., Demirhan, E., Özel, B. & Özbek, B. (2017) Kefir grain biomass production: Influence of different culturing conditions and examination of growth kinetic models, *Journal of Food Process Engineering*, 40(1), p. 12332.

- Arana, S., Alves, V. A. F., Sabino, M., Tabata, Y. A., Nonogaki, S., Zaidan-Dagli, M. L. & Hernandez-Blazquez, F. J. (2014) Immunohistochemical evidence for myofibroblast-like cells associated with liver injury induced by aflatoxin b1 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Journal of Comparative Pathology*. 150(2-3), pp. 258-265.
- Araujo, R., & Cabral, J. P. (2010). Fungal air quality in medical protected environments. In *Air quality*. InTech.
- Araujo, R., & Rodrigues, A. G. (2004). Variability of germinative potential among pathogenic species of *Aspergillus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(9), pp 4335-4337.
- Arné, P., Thierry, S., Wang, D., Deville, M., Loc h, G. Le, Desoutter, A., Féménia, F., Nieguitsila, A., Huang, W., Chermette, R. & Guillot, J. (2011) *Aspergillus fumigatus* in poultry., *International Journal of Microbiology*, 2011 pp: 1-14
- Arroyo-Manzanares, Natalia., Huertas-Pérez, J. F., Gámiz-Gracia, Laura, & García-Campaña, A. M. (2014). Control de micotoxinas en alimentos. *Boletín Graseqa*, 7, pp 16-31.
- Association Of Official Agricultural Chemists (AOAC). (2012). *Official methods of analysis 991.36: fat in feeds*. 19th ed. Gaithersburg (USA):
- Axelsson, L. (2004) *Lactic acid bacteria: classification and physiology*. in: *lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects*, Third Edition, Revised and Expanded, edited by Salminen, S., von Wriqth, A., & Ouwehwn d, A. (Marcel Dekker, Inc).
- Bacon, C. W., Yates, I. E., Hinton, D. M. & Meredith, F. (2001) *Biological control of Fusarium moniliforme in maize.*, *Environ Health Perspect*, 109(2), pp. 325-332.
- Balajee, S. A. (2009). *Aspergillus terreus* complex. *Medical mycology*, 47(sup1), S42-S46.
- Balajee, S. A., Borman, A. M., Brandt, M. E., Cano, J., Cuenca-Estrella, M., Dannaoui, E., Guarro, J., Haase, G., Kibbler, C. C., Meyer, W., O Donnell, K., Petti, C. A., Rodriguez-Tudela, J. L., Sutton, D., Velegraki, A. & Wickes, B. L. (2009) *Sequence-based identification of Aspergillus fusarium, and mucorales species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here?.*, *Journal of clinical microbiology*. *American Society for Microbiology*, 47(4), pp. 877-84.
- Balls, M. (1994). *Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing*. *Laboratory animals*, 28(3), pp 193-211..
- Barroeta, A. C., Izquierdo, D. & Perez, J. F. (2011) *Manual De Avicultura, Direccion Provincial de educación técnica profesional (dirección de educación agraria)* Buenos Aires, Argentina Manual, pp. 35-36-37.

- Barros, G., Magnoli, C., Reynoso, M., Ramirez, M., Farnochi, M., Torres, A., Dalcero, M., Sequeira, J., Rubinstein, C. & Chulze, S. (2009) Fungal and mycotoxin contamination in Bt maize and non-Bt maize grown in Argentina, *World Mycotoxin Journal*, 2(1), pp. 53–60.
- Bellhorn, T., & Macintire, D. K. (2004). Bacterial translocation. *Compendium On Continuing Education For The Practising Veterinarian-North American Edition-*, 26(3), pp. 229-235.
- Bengoa, A. A., Zavala, L., Carasi, P., Trejo, S. A., Bronsoms, S., Serradell, M. de los Á., Garrote, G. L. & Abraham, A. G. (2017) Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin., *Food Research International*.
- Berry, W. L. and Leisewitz, A. L. (1996) Multifocal *Aspergillus terreus* discospondylitis in two German shepherd dogs., *Journal of the South African Veterinary Association*, 67(4), p. 222.
- Bertholon, I., Ponchel, G., Labarre, D., Couvreur, P., & Vauthier, C. (2006). Bioadhesive properties of poly (alkylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysaccharide. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 6(9-10), pp 3102-3109.
- Blajman, J. E., Frizzo, L. S., Zbrun, M. V., Astesana, D. M., Fusari, M. L., Soto, L. P., Rosmini, M. R. & Signorini, M. L. (2014) Probiotics and broiler growth performance: a meta-analysis of randomised controlled trials, *British Poultry Science*, 55(4), pp. 483–494.
- Blajman, J. E., Zbrun, M. V., Astesana, D. M., Berisvil, A. P., Romero Scharpen, A., Fusari, M. L., Soto, L. P., Signorini, M. L., Rosmini, M. R. & Frizzo, L. S. (2015) Probióticos en pollos parrilleros: una estrategia para los modelos productivos intensivos, *Revista Argentina de Microbiología. Asociación Argentina de Microbiología*, 47(4), pp. 360–367.
- Bogliachini, A. (2006). Refrigeración. *Revista Granos & Postcosecha Latinoamericana. De la semilla al consumo*, 11(56), pp 18-20.
- Bondy, G. S. & Pestka, J. J. (2000) Immunomodulation by fungal toxins, *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews.*, 3(2), pp. 109–143.
- Borrell, J., & Gimeno, G. (2003). Micotoxinas en los alimentos: medidas de prevención y detoxificación. *Alimentación*, pp 567, 569-71.
- Bracey, D., Holyoak, C. D. & Coote, P. J. (1998) Comparison of the inhibitory effect of sorbic acid and amphotericin B on *Saccharomyces cerevisiae*: is growth inhibition dependent on reduced intracellular pH, *Journal of Applied Microbiology*, 85(6), pp. 1056–1066.

- Bradburn, N., Coker, R. D. & Blunden, G. (1994) The aetiology of turkey "x" disease, *Phytochemistry*. 35(3), p. 817
- Braun, J. P. & Lefebvre, H. P. (2008) Kidney Function and Damage, in *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, pp. 485–528.
- Brul, S. & Coote, P. (1999) Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms, *International Journal of Food Microbiology*., 50(1–2), pp. 1–17.
- Bruno, F., (2016) Estudio de una formulación simbiótica a partir de lactobacilos crecidos en permeado de suero lácteo enriquecido en galacto-oligosacáridos. Trabajo final de Grado. Facultad de ciencias exactas. Universidad Nacional de La Plata. Argentina
- Bueno D. J. (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). 217 p.
- Bueno, D. J., Casale, C. H., Pizzolitto, R. P., Salvano, M. a & Oliver, G. (2007) Physical adsorption of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model., *Journal of food protection*, 70(9), pp. 2148–54.
- Bueno, D. J., Salvano, M., Silva, J. O., González, S. N., & Oliver, G. (2001). Micotoxinas: diagnóstico y prevención en aves de corral. *Boletín Micológico*, p 16.
- Burns, P., Patrignani, F., Serrazanetti, D., Vinderola, G. C., Reinheimer, J. A., Lanciotti, R., & Guerzoni, M. E. (2008). Probiotic Crescenza cheese containing *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* manufactured with high-pressure homogenized milk. *Journal of Dairy Science*, 91(2), 500-512.
- Cabañes, F. J., Accensi, F., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., Castellá, G., Minguez, S. & Pons, A. (2002) What is the source of ochratoxin A in wine?, *International Journal of Food Microbiology*, 79(3), pp. 213–215.
- Cafarchia, C., Camarda, A., Iatta, R., Danesi, P., Favuzzi, V., Di Paola, G., Pugliese, N., Caroli, A., Montagna, M. T. & Otranto, D. (2014) Environmental contamination by *Aspergillus* spp. in laying hen farms and associated health risks for farm workers., *Journal of Medical Microbiology*, 63(PART 3), pp. 464–470.
- Caly, D. L., D Inca, R., Auclair, E. & Djamel, D. (2015) Alternatives to Antibiotics to Prevent Necrotic Enteritis in Broiler Chickens: A Microbiologist s Perspective, *Frontiers in Microbiology*, 6, pp. 1–12.

- Capasso, C. & Supuran, C. T. (2015) Bacterial, fungal and protozoan carbonic anhydrases as drug targets., *Expert Opinion on Therapeutic Targets.*, 19(12), pp. 1689–1704.
- Caplice, E. & Fitzgerald, G. F. (1999) Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation, *International Journal of Food Microbiology*, 50(1–2), pp. 131–149.
- Carasi, P. (2008) “Diversidad genética y patogenicidad de *Shigella* spp ” Prácticas Bioquímicas Especiales de Investigación Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata . Argentina
- Carasi, P., Ambrosio, N. M., De Antoni, G. L., Bressollier, P., Urdaci, M. C. & Serradell, M. D. L. A. (2014) Adhesion properties of potentially probiotic *Lactobacillus kefir* to gastrointestinal mucus., *The Journal of dairy research*, 81(1), pp. 16–23.
- Carasi, P., Trejo, F. M., Pérez, P. F., De Antoni, G. L., & Serradell, M.D.L.A. (2012). Surface proteins from *Lactobacillus kefir* antagonize in vitro cytotoxic effect of *Clostridium difficile* toxins. *Anaerobe*, 18(1), 135-142.
- Caro Velez, C. A. & Peláez, Á. M. L. (2015). Capacidad antifúngica de sobrenadantes libres de células obtenidos de la fermentación de un sustrato de "panela" con gránulos de kéfir de agua. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), p 22.
- Carvajal-Campos, A., Manizan, A., Tadrist, S., Akaki, D., Koffi-Nevry, R., Moore, G., Fapohunda, S., Bailly, S., Montet, D., Oswald, I., Lorber, S., Brabet, C. & Puel, O. (2017) *Aspergillus korhogoensis*, a Novel Aflatoxin Producing Species from the Côte d Ivoire., *Toxins. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 9(12), p. 353.
- Caspary, W. F. (1992) Physiology and pathophysiology of intestinal absorption., *The American journal of clinical nutrition*, 55(1 Suppl), p. 299S–308S.
- Cenesiz, S., Yaman, H., Ozcan, A. & Karademir, G. (2008) Effects of kefir as a probiotic on serum cholesterol, total lipid, aspartate amino transferase and alanine amino transferase activities in broiler chicks, *Medycyna Wet.*, 64(2), pp. 168–170.
- Chambers, J. R. & Gong, J. (2011) The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens, *Food Research International*, pp. 3149–3159.
- Charalampopoulos, D. & Pandiella, S. S. (2010) Survival of human derived *Lactobacillus plantarum* in fermented cereal extracts during refrigerated storage, *Food Science and Technology.*, 43(3), pp. 431–435.

- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. & Collins, J. K. (1998) Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species., *Journal of food protection*, 61(12), pp. 1636–1643.
- Chen, J., Peng, H., Wang, X., Shao, F., Yuan, Z. & Han, H. (2014) Graphene oxide exhibits broad-spectrum antimicrobial activity against bacterial phytopathogens and fungal conidia by intertwining and membrane perturbation, *Nanoscale. The Royal Society of Chemistry*, 6(3), pp. 1879–1889.
- Chen, Z. T., Chu, H. L., Chyau, C. C., Chu, C. C., & Duh, P. D. (2012). Protective effects of sweet orange (*Citrus sinensis*) peel and their bioactive compounds on oxidative stress. *Food chemistry*, 135(4), 2119-2127.
- Cheng, C., Yang, Y., Dong, Z., Wang, X., Fang, C., Yang, M., Sun, J., Xiao, L., Fang, W. & Song, H. (2015) *Listeria monocytogenes* varies among strains to maintain intracellular pH homeostasis under stresses by different acids as analyzed by a high-throughput microplate-based fluorometry. *Frontiers in microbiology.*, 6, p. 15.
- Cheng, J., Huang, S., Fan, C., Zheng, N., Zhang, Y., Li, S. & Wang, J. (2017) Metabolomic analysis of alterations in lipid oxidation, carbohydrate and amino acid metabolism in dairy goats caused by exposure to Aflatoxin B1, *Journal of Dairy Research*. 84(4), pp. 401–406.
- Cherrington, C. A., Hinton, M., Pearson, G. R., & Chopra, I. (1991). Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. without causing membrane perturbation. *Journal of Applied Microbiology*, 70(2), 161-165.
- Chhabra, R. S. (1979). Intestinal absorption and metabolism of xenobiotics. *Environmental health perspectives*, 33 p 61
- Chiappe, G. (2010). Pautas de manejo para crianza de pollos parrilleros : análisis de un caso bajo condiciones reales de producción en galpones con sistema manual y automático de alimentación Trabajo final, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Católica Argentina.
- Chittmitrapap, S., Chieochansin, T., Chaiteerakij, R., Treeprasertsuk, S., Klaikaew, N., Tangkijvanich, P., & Poovorawan, Y. (2013). Prevalence of aflatoxin induced p53 mutation at codon 249 (R249s) in hepatocellular carcinoma patients with and without hepatitis B surface antigen (HBsAg). *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(12), 7675-7679.

- Chiu, C. P. & Kosikowski, F. V. (1985) Hydrolyzed Lactose Syrup from Concentrated Sweet Whey Permeates, *Journal of Dairy Science*, 68(1), pp. 16–22.
- Cho, J. H., Zhang, Z. F. & Kim, I. H. (2013) Effects of single or combined dietary supplementation of β -glucan and kefir on growth performance, blood characteristics and meat quality in broilers, *British Poultry Science.*, 54(2), pp. 216–221.
- Choi, K. C., Chung, W. T., Kwon, J. K., Yu, J. Y., Jang, Y. S., Park, S. M., Lee, S. Y. & Lee, J. C. (2010) Inhibitory effects of quercetin on aflatoxin B1-induced hepatic damage in mice, *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), pp. 2747–2753.
- Christensen C.M. (1987). *Food and Beverage Mycology* 2 ed, New York: Van Nostrand Reinhold, pp 23-134.
- Chulze, S. N., Palazzini, J. M., Torres, A. M., Barros, G., Ponsone, M. L., Geisen, R., Schmidt-Heydt, M. & Köhl, J. (2015) Biological control as a strategy to reduce the impact of mycotoxins in peanuts, grapes and cereals in Argentina, *Food Additives & Contaminants*: 32(4), pp. 471–479.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., & Comi, G. (2001). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), pp 5113-5121.
- Código Alimentario Argentino (CAA), Artículo 982 (Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA 68/2007 y 196/2007). Capítulo XII. Agua Potable. Bebidas hídricas, agua y agua gasificada.
- Colello, R., Etcheverría, A. I., Conza, J. A. Di, Gutkind, G. O. & Padola, N. L. (2015) Antibiotic resistance and integrons in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)., *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), pp. 1–5. .
- Correa Franco, M., Golowczyc, M. A., De Antoni, G. L., Pérez, P. F., Humen, M. & Serradell, M. de los A. (2013) Administration of kefir-fermented milk protects mice against *Giardia intestinalis* infection., *Journal of Medical Microbiology*, 62(PART 12), pp. 1815–1822.
- Cortés-Zavaleta, O., López-Malo, A., Hernández-Mendoza, A. & García, H. S. (2014) Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production., *International Journal of Food Microbiology*. 173, pp. 30–35.
- Coté, A., Brown, W. A., Cameron, D. & van Walsum, G. P. (2004) Hydrolysis of Lactose in Whey Permeate for Subsequent Fermentation to Ethanol., *Journal of Dairy Science*, 87(6), pp. 1608–1620.

- da Rocha, A. P., Abreu, R. D., Marques da Costa, M. D. C. M., de Oliveira, G. J. C., Albinati, R. C. B., da Paz, A. S., & Pedreira, T. M. (2010). Prebióticos, ácidos orgânicos e probióticos em rações para frangos de corte. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 11(3).
- Dagenais, T. R. T. & Keller, N. P. (2009) Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis, *Clinical Microbiology Reviews*, pp. 447–465.
- Dal Bello, F., Clarke, C. I., Ryan, L. A. M., Ulmer, H., Schober, T. J., Ström, K., Sjögren, J., van Sinderen, D., Schnürer, J. & Arendt, E. K. (2007) Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7., *Journal of Cereal Science*, 45(3), pp. 309–318.
- Dalcero, A., Magnoli, C., Chiacchiera, S., Palacios, G. & Reynoso, & M. (1997) Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina., *Mycopathologia*, 137, pp. 179–184.
- Dalié, D. K D, A. M. Deschamps, & F. Richard-Forget. 2010. Lactic Acid Bacteria -Potential for Control of Mould Growth and Mycotoxins: A Review. *Food Control* 21 (4). 370–80.
- Dan, Z., Popov, Y., Patsenker, E., Preimel, D., Liu, C., Wang, X. D., & Stickel, F. (2005). Hepatotoxicity of alcohol-induced polar retinol metabolites involves apoptosis via loss of mitochondrial membrane potential. *The FASEB journal*, 19(7), 845-847.
- Daşkıran, M., Öno, A. G., Cengiz, Ö., Ünsal, H., Türkyilmaz, S., Tatlı, O. & Sevim, O. (2012) Influence of dietary probiotic inclusion on growth performance, blood parameters, and intestinal microflora of male broiler chickens exposed to posthatch holding time., *Journal of Applied Poultry Research*, 21(3), pp. 612–622.
- Davidson, M.P., 2001. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM press, Washington DC, pp. 593–627
- Davies, N. T. (1980). Studies on the absorption of zinc by rat intestine. *British Journal of Nutrition*, 43(1), 189-203.
- Deak, E., Nelson, M., Hernández-Rodríguez, Y., Gade, L., Baddley, J., Momany, M., Steele, C. & Balajee, S. A. (2011) *Aspergillus terreus* accessory conidia are multinucleated, hyperpolarizing structures that display differential dectin staining and can induce heightened inflammatory responses in a pulmonary model of aspergillosis., *Virulence*, 2(3), pp. 200–207.

- DeBey, M. C., Trampel, D. W., Richard, J. L., Bundy, D. S., Hoffman, L. J., Meyer, V. M. & Cox, D. F. (1995) Effect of environmental variables in turkey confinement houses on airborne *Aspergillus* and mycoflora composition, *Poultry Science*, 74(3), pp. 463–471.
- Del Bianchi, M., Oliveira, C. A., Albuquerque, R., Guerra, J. L. & Correa, B. (2005) Effects of prolonged oral administration of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in broiler chickens, *Poultry Science*, 84, pp. 1835–1840.
- Delfederico, L., Hollmann, A., Martínez, M., Iglesias, N. G., De Antoni, G., & Semorile, L. (2006). Molecular identification and typing of lactobacilli isolated from kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 73(1), 20-27.
- Díaz, D., Rivero, D., Collante, J. & Gonzalez, D. (2007) Evaluación productiva (IOR) en una granja de pollos de engorde del estado Trujillo de Venezuela con dos sistemas de producción (estudio de casos), *Agricultura Andina*, 12, pp. 55–65.
- Diosma, G., Romanin, D. E., Rey-Burusco, M. F., Londero, A., & Garrote, G. L. (2014). Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(1), pp.43-53.
- Dorner, J. W. & Horn, B. W. (2007) Separate and combined applications of nontoxigenic *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* for biocontrol of aflatoxin in peanuts, *Mycopathologia*, 163(4), pp. 215–223.
- Dunkley, K. D., Callaway, T. R., Chalova, V. I., McReynolds, J. L., Hume, M. E., Dunkley, C. S., Kubena, L. F., Nisbet, D. J. and Ricke, S. C. (2009) Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract, *Anaerobe*, 15(1–2), pp. 26–35.
- Eckert, N. H., Lee, J. T., Hyatt, D., Stevens, S. M., Anderson, S., Anderson, P. N., Beltran, R., Schatzmayr, G., Mohnl, M. & Caldwell, D. J. (2010) Influence of probiotic administration by feed or water on growth parameters of broilers reared on medicated and nonmedicated diets, *The Journal of Applied Poultry Research*. 19(1), pp. 59–67.
- Ehrlich, K. C. (2014). Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* to prevent aflatoxin contamination in crops: advantages and limitations. *Frontiers in microbiology*, 5, p50.
- Elad, D., Lahav, D. & Blum, S. (2008) Transuterine transmission of *Aspergillus terreus* in a case of disseminated canine aspergillosis, *Medical Mycology*, 46(2), pp. 175–178.
- El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S. & Ahokas, J. (1998) Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1, *Food and Chemical Toxicology*., 36(4), pp. 321–326.

- El-Nezami, H., Mykkänen, H., Kankaanpää, P., Salminen, S. & Ahokas, J. (2000) Ability of Lactobacillus and Propionibacterium Strains to Remove Aflatoxin B 1 from the Chicken Duodenum, *Journal of Food Protection*. International Association for Food Protection, 63(4), pp. 549–552.
- Fakruddin, M., Chowdhury, A., Hossain, M. N. & Ahmed, M. M. (2015) Characterization of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* from food and feed samples, SpringerPlus. Nature Publishing Group, 4(1), p. 159.
- FAO (2003) Manual Sobre la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la Prevención y Control de las Micotoxinas. <http://www.fao.org/docrep/005/Y1390S/Y1390S00.HTM>
- Farnworth, E. R. (2006). Kefir a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin*; 2(1), 1-17.
- Farrelly V., Rainey F. A. & Stackebrandt E. 1995. Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Applied of Environmental Microbiology*. 61, 2798–2801
- Felsenstein, J. (1985) CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP., *Evolution*, 39(4), pp. 783–791.
- Fernandez Pinto, V. E., Terminiello, L. A., Basílico, J. C. & Ritieni, A. (2008) Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium graminearum* strains in wheat affected by head blight in Argentina, *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), pp. 157–162.
- Fernández, A., Verde, M. T., Gascon, M., Ramos, J., Gomez, J., Luco, D. F. & Chavez, G. (1994) Variations of clinical biochemical parameters of laying hens and broiler chickens fed aflatoxin containing feed, *Avian Pathology*, 23, pp. 37–41.
- Fernandez, B., Vimont, A., Desfossés-Foucault, É., Daga, M., Arora, G. & Fliss, I. (2017) Antifungal activity of lactic and propionic acid bacteria and their potential as protective culture in cottage cheese, *Food Control*, 78, pp. 350–356.
- Fetaih, H. A., Dessouki, A. A., Hassanin, A. A. I. & Tahan, A. S. (2014) Toxopathological and cytogenetic effects of aflatoxin B1 (AFB1) on pregnant rats, *Pathology Research and Practice*. 210(12), pp. 1079–1089.
- Food and Drug Administration (2009) Mycotoxins in Domestic and Imported Foods, FDA Compliance Program Guidance Manual, 2438.

- Fotakis, G. & Timbrell, J. A. (2006) In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology Letters*, 160(2), pp. 171–177.
- Fraga, M. E., Curvello, F., Gatti, M. J., Cavaglieri, L. R., Dalcero, A. M. & da Rocha Rosa, C. A. (2007) Potential aflatoxin and ochratoxin A production by *Aspergillus* species in poultry feed processing, *Veterinary Research Communications*, 31(3), pp. 343–353.
- Frézal, L. & Leblois, R. (2008) Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects, *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), pp. 727–736.
- Frizzo, L. S., Soto, L. P., Zbrun, M. V., Signorini, M. L., Bertozzi, E., Sequeira, G., Armesto, R. R., Rosmini, M. R., Rombouts, F. M. & Beynen, A. C. (2011) Effect of lactic acid bacteria and lactose on growth performance and intestinal microbial balance of artificially reared calves, *Livestock Science*. In CD rom, FCV-UNL, 140(1–3), pp. 246–252.
- Fu, W. & Mathews, A. P. (1999) Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen, *Biochemical Engineering Journal*, 3(3), pp. 163–170.
- Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M. & Knasmüller, S. (2008) Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria, *Food and Chemical Toxicology*, 46(4), pp. 1398–1407.
- Galarza-Seeber, R., Latorre, J. D., Bielke, L. R., Kuttappan, V. A., Wolfenden, A. D., Hernandez-Velasco, X., Merino-Guzman, R., Vicente, J. L., Donoghue, A., Cross, D., Hargis, B. M. & Tellez, G. (2016) Leaky gut and mycotoxins: aflatoxin B1 does not increase gut permeability in broiler chickens., *Frontiers in Veterinary Science*, 3, p. 10.
- Gamba, R. R. (2015) Estudio del potencial del kefir como agente antifúngico. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas Universidad Nacional de La Plata.
- Gamba, R. R., Caro, C. A., Martínez, O. L., Moretti, A. F., Giannuzzi, L., De Antoni, G. L. and León Peláez, A. (2016a) Antifungal effect of kefir fermented milk and shelf life improvement of corn arepas, *International Journal of Food Microbiology*. 235, pp. 85–92.
- Gamba, R. R., Colo, C. N., Correa, M., Astoreca, A., Alconada, T., Antoni, G. De & Peláez, A. L. (2015a) Antifungal activity against *Aspergillus parasiticus* of supernatants from Whey permeates fermented with kefir grains, *Advances in Microbiology*, 5(June), pp. 479–492.

- Gamba, R. R., De Antoni, G. & León Peláez, Á. M. (2015b) Whey permeate fermented with kefir grains shows antifungal effect against *Fusarium graminearum*., *Journal of Dairy Research*, 83(2), pp. 249–255..
- Gamba, R. R., Moure, C., Diosma, G., Giannuzzi, L., Liliana, G., Antoni, D., María, Á., Peláez, L. & Gamba, R. R. (2016b) Application of whey permeate fermented with kefir grains for the shelf-life improvement of food and feed., *Advances in Microbiology*, pp. 650–661.
- García-Hernández, Y., Pérez-Sánchez, T., Boucourt, R., Balcázar, J. L. & Nicoli, J. R. (2016) Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production, *Research in Veterinary Science*. 108, pp. 125–132.
- Garmendia, G. & Vero, S. (2016) Occurrence and biodiversity of *Aspergillus* section *Nigri* on “Tannat” grapes in Uruguay., *International Journal of Food Microbiology*. 216, pp. 31–39.
- Garrido, C. E., Hernández Pezzani, C. & Pacin, A. (2012) Mycotoxins occurrence in Argentina s maize (*Zea mays* L.), from 1999 to 2010., *Food Control*. 25(2), pp. 660–665.
- Garrote G L (1999). Bacterias lácticas y levaduras para la industria alimentaria: kefir. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G. & De Antoni, G. L. (2000) Inhibitory power of kefir: the role of organic acids, *Journal of Food Protection*, 63(3), pp. 364–369.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G. & De Antoni, G. L. (2001) Chemical and microbiological characterisation of kefir grains., *The Journal of Dairy Research*, 68(4), pp. 639–52.
- Gerbino, O. E. (2013). Interacción de *Lactobacillus kefir* con plomo, cadmio, níquel y zinc: Análisis estructural y estudio de la capacidad secuestrante a nivel molecular Tesis Doctora. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.
- Gerez, C. L., Torino, M. I., Rollán, G. & Font de Valdez, G. (2009) Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties, *Food Control*, 20(2), pp. 144–148.
- Gerez, C. L., Torres, M. J., Font de Valdez, G. & Rollán, G. (2013) Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria, *Biological Control*. 64 (3), pp. 231–237.
- Giannuzzi, L., Contreras, E. & Zaritzky, N. (1999) Modeling the Aerobic Growth and Decline of *Staphylococcus aureus* as Affected by pH and Potassium Sorbate Concentration, *Journal of Food Protection*., 62(4), pp. 356–362.
- Gil, F., & Pla, A. (2001). Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *Journal of applied toxicology*, 21(4), 245-255.

- Goldman, R. & Shields, P. G. (2003) Food Mutagens., *J. Nutr.*, 133(3), p. 965S–973.
- Golowczyc, M. A, Gugliada, M. J., Hollmann, A., Delfederico, L., Garrote, G. L., Abraham, A. G., Semorile, L. & De Antoni, G. (2008) Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: potential use as probiotic., *The Journal of dairy research*, 75(2), pp. 211–7.
- Golowczyc, M.A, Gerez, C.L., Silva, J., Abraham, A. G., De Antoni, G. L. & Teixeira, P. (2011) Survival of spray-dried *Lactobacillus kefir* is affected by different protectants and storage conditions., *Biotechnology Letters*, 33(4), pp. 681–6.
- González C., M.. (2012). Aspectos medio ambientales asociados a los procesos de la industria láctea. *Mundo Pecuario* 1, pp 16–32.
- González Siso, M. I. (1996) The biotechnological utilization of cheese whey: A review, *Bioresource Technology*, pp. 1–11.
- González, B. A., Domínguez-Espinosa, R., & Alcocer, B. R. (2008). Aloe vera como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* y *L. casei* use of Aloe vera juice as substrate for growth of *Lactobacillus plantarum* and *L. casei*. *CYTA-Journal of Food*, 6(2), 152-157.
- Gould, G. W. (1995). *New methods of food preservation*. G. W. Gould (Ed.). London: Blackie Academic & Professional
- Gowda, S., Desai, P. B., Hull, V. V, Math, A. a K, Vernekar, S. N. & Kulkarni, S. S. (2009) A review on laboratory liver function tests., *The Pan African medical journal*, 3(November), p. 17.
- Gratz, S. (2007). Aflatoxin binding by probiotics: experimental studies on intestinal aflatoxin transport, metabolism and toxicity. Tesis Doctoral. University of Kuopio.
- Gratz, S., Mykkänen, H. & El-nezami, H. (2005) Aflatoxin B1 binding by a mixture of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*: In Vitro Vs Ex Vivo, *Journal of Food Protection. International Association for Food Protection*, 68(11), pp. 2470–2474.
- Gratz, S., Mykkänen, H., Ouwehand, A. C., Juvonen, R., Salminen, S., & El-Nezami, H. (2004). Intestinal mucus alters the ability of probiotic bacteria to bind aflatoxin B1 in vitro. *Applied and environmental microbiology*, 70(10), 6306-6308.
- Grimoud, J., Durand, H., Courtin, C., Monsan, P., Ouarné, F., Theodorou, V., & Roques, C. (2010). In vitro screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. *Anaerobe*, 16(5), 493-500.

- Grm, B., Mele, M. & Kremser, M. (1980) Model of growth and ergot alkaloid production by *Claviceps purpurea*, *Biotechnology and Bioengineering*, 22(2), pp. 255–270.
- Guimarães, A., Santiago, A., Teixeira, J. A., Venâncio, A. & Abrunhosa, L. (2018) Anti-aflatoxigenic effect of organic acids produced by *Lactobacillus plantarum*, *International Journal of Food Microbiology*. 264, pp. 31–38.
- Gunasekaran, S., & Ak, M. M. (2002). *Cheese rheology and texture*. CRC press.
- Haiser, H. J., & Turnbaugh, P. J. (2013). Developing a metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Pharmacological research*, 69(1), pp 21-31..
- Hajela, N., Nair, G. B., Abraham, P. & Ganguly, N. K. (2012) Health impact of probiotics vision and opportunities., *Gut pathogens*. 4(1), p. 1.
- Hakansson, A. & Molin, G. (2011) Gut microbiota and inflammation., *Nutrients*, 3(6), pp. 637–82.
- Hallé, C., Leroi, F., Dousset, X., & Pidoux, M. (1994). Les kéfirs: des associations bactéries lactiques-levures. *Bactéries lactiques: Aspects fondamentaux et technologiques*, 2, pp 169-182.
- Hamet, M. F., Piermaria, J. A. & Abraham, A. G. (2015) Selection of EPS-producing *Lactobacillus* strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks., *LWT - Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, 63(1), pp. 129–135.
- Hansen M. C., Tolker-Nielsen T., Givskov M. & Molin S. 1998. Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiology Ecology*. 262, 141-149.
- Hasan, S., Hossain, M. M. & Bhuiyan, M. E. R. (2015) Growth performance and hemato-biochemical parameters in broiler during high environmental temperature by the application of synbiotic, 13(1), pp. 157–162.
- Hashem, M. & Mohamed, M. H. (2009) Haemato-biochemical and pathological studies on aflatoxicosis and treatment of broiler chicks in Egypt., *Veterinaria italiana*, 45(2), pp. 323–337.
- Haskard, C. A., El-Nezami, H. S., Kankaanpää, P. E., Salminen, S. & Ahokas, J. T. (2001) Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria., *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology, 67(7), pp. 3086–91.
- Haugland, R. A., Varma, M., Wymer, L. J. & Vesper, S. J. (2004) Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* species, *systematic and applied Microbiology*, 27(2), pp. 198–210.

- He, Q., Wang, S. Z., Leng, L., Na, W., Wang, Q. G. & Li, H. (2014) Differentially expressed genes in the liver of lean and fat chickens, *Genetics and Molecular Research*, 13(4), pp. 10823–10828.
- Heckert, R. A., Estevez, I., Russek-Cohen, E. & Pettit-Riley, R. (2002) Effects of density and perch availability on the immune status of broilers, *Poultry Science*, 81(4), pp. 451–457.
- Henry, T., Iwen, P. C. & Hinrichs, S. H. (2000) Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2., *Journal of clinical microbiology.*, 38(4), pp. 1510–5.
- Herzallah, S. M. (2009) Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors., *Food Chemistry*. 114(3), pp. 1141–1146.
- Heuer H. & Smalla K. 1997. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. In: *Modern Soil Microbiology*. Eds.: van Elsas J. D., Trevors J. T. & Wellington E. M. H. Marcel Dekker, New York. pp. 353–373
- Higgins, S. E., Erf, G. F., Higgins, J. P., Henderson, S. N., Wolfenden, A. D., Gaona-Ramirez, G & Hargis, B. M. (2007) Effect of probiotic treatment in broiler chicks on intestinal macrophage numbers and phagocytosis of *Salmonella enteritidis* by abdominal exudate cells, *Poultry Science*, 86(11), pp. 2315–2321.
- Hovell, R. (2013). Reduction, refinement and replacement. *Veterinary Record*, 172(26), pp. 691-691.
- Hsieh, L. L., Hsu, S. W., Chen, D. S., & Santella, R. M. (1988). Immunological detection of aflatoxin B1-DNA adducts formed in vivo. *cancer research*, 48(22),pp. 6328-6331.
- Huang, W. C., Chen, Y. M., Kan, N. W., Ho, C. S., Wei, L., Chan, C. H., Huang, H. Y. & Huang, C. C. (2015) Hypolipidemic effects and safety of *Lactobacillus Reuteri* 263 in a hamster model of hyperlipidemia, *Nutrients*, 7(5), pp. 3767–3782.
- Hugo, A. A., Bruno, F. & Golowcycz, M. A. (2016) Whey permeate containing galactooligosaccharides as a medium for biomass production and spray drying of *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114., *Food Science and Technology*, 69, pp. 185–190.
- Hugo, A. A., De Antoni, G. L. & Pérez, P. F. (2010) *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* (strain CIDCA 133) resists the antimicrobial activity triggered by molecules derived from enterocyte-like Caco-2 cells., *Letters in Applied Microbiology*, 50(4), pp. 335–40.

- Humen, M. a, Pérez, P. F. & Liévin-Le Moal, V. (2011) Lipid raft-dependent adhesion of *Giardia intestinalis* trophozoites to a cultured human enterocyte-like Caco-2/TC7 cell monolayer leads to cytoskeleton-dependent functional injuries., *Cellular microbiology*, 13(11), pp. 1683–1702.
- Humen, Martín. (2009). Interacción de *Giardia intestinalis* con el hospedador. Efecto antagónico de probióticos intestinales. Tesis Doctora. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.
- Hussain, Z., Khan, M. Z., Khan, A., Javed, I., Saleemi, M. K., Mahmood, S. & Asi, M. R. (2010) Residues of aflatoxin B1 in broiler meat: Effect of age and dietary aflatoxin B1 levels., *Food and Chemical Toxicology*, 48(12), pp. 3304–3307.
- Hussein, H. (2001) Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals., *Toxicology*, 167(2), pp. 101–134.
- IARC (2012) Aflatoxins, Iarc Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks on Humans. 100 F, pp. 225–248.
- Illanes, A. (2011) Whey upgrading by enzyme biocatalysis, *Electronic Journal of Biotechnology*. Universidad Católica de Valparaíso and CONICYT, 14(6), pp. 9–9.
- Iraporda, C. (2010) Caracterización química y microbiológica de gránulos de kefir de agua y su producto fermentado . Tesis de grado. Facultad de Ciencias Exactas Licenciatura en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de La Plata.
- Irinyi, L., Serena, C., Garcia-Hermoso, D., Arabatzis, M., Desnos-Ollivier, M., Vu, D., ... & da Cunha, K. C. (2015). International society of human and animal mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database—the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Medical mycology*, 53(4), 313-337.
- Ismail, A. A., Ghaly, M. F., & El-Naggar, A. K. (2011). Milk kefir: ultrastructure, antimicrobial activity and efficacy on aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. *Current microbiology*, 62(5), 1602-1609.
- Jaimes, J. A., Álvarez, D. C., Correa, J. J. & Vera, V. J. (2009) Aspectos determinantes en la presentación de la enfermedad infecciosa de la bursa. *Revista de Medicina Veterinaria*, 17, pp. 11–22.
- Jaiswal, A. K., Gupta, S. & Abu-Ghannam, N. (2012) Optimisation of lactic acid fermentation of York cabbage for the development of potential probiotic products. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(8), pp. 1605–1612.

- Jauregui, H. O., Hayner, N. T., Driscoll, J. L., Williams-Holland, R., Lipsky, M. H. & Galletti, P. M. (1981) Trypan blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes Freshly isolated cells, cell suspensions, and primary monolayer cultures. *In Vitro*. Springer-Verlag, 17(12), pp. 1100–1110.
- Jeannot, E., Boorman, G. A., Kosyk, O., Bradford, B. U., Shymoniak, S., Tumurbaatar, B., Weinman, S. A., Melnyk, S. B., Tryndyak, V., Pogribny, I. P. & Rusyn, I. (2012) Increased incidence of aflatoxin B1 induced liver tumors in hepatitis virus C transgenic mice. *International Journal of Cancer*, 130(6), pp. 1347–1356.
- Jha, A., Krithika, R., Manjeet, D. & Verma, R. J. (2013) Protective Effect of Black Tea Infusion on Aflatoxin-Induced Hepatotoxicity in Mice., *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. Elsevier Ltd, 3(1), pp. 29–36.
- Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., & Jalaludin, S. (2000). Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. *Poultry science*, 79(6), 886-891.
- Joint FAO/WHO Working Group, & Joint FAO/WHO Working Group. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London: World Health Organization, ON, Canada: Food and Agriculture Organization.
- Jørgensen, T. R. (2007) Identification and Toxigenic Potential of the Industrially Important Fungi, *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*. *Journal of Food Protection*. 70(12), pp. 2916–2934.
- Jukes, T. h. & Cantor, C. r. (1969) Evolution of Protein Molecules. *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21–132.
- Jurado, M., Vázquez, C., Patiño, B. & González-Jaén, M. T. (2005) PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(6), pp. 562–568.
- Kabak, B., Dobson, A. D., & Var, I. I. L. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 46(8), 593-619.
- Kachouri, f., Ksontini, h. & Hamdi, M. (2014) Removal of aflatoxin B1 and inhibition of *Aspergillus flavus* growth by the use of *Lactobacillus plantarum* on olives. *Journal of Food Protection*, 77(10), pp. 1760–1767.

- Kakisu, E., Abraham, A. G., Farinati, C. T., Ibarra, C. & De Antoni, G. L. (2013a) *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir protects vero cells from cytotoxicity by type-II shiga toxin from *Escherichia coli* O157:H7., *The Journal of dairy research*, 80(1), pp. 64–71.
- Kakisu, E., Bolla, P., Abraham, A. G., de Urza, P. & De Antoni, G. L. (2013b) *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir: Protection of cultured Hep-2 cells against *Shigella* invasion, *International Dairy Journal*. Elsevier Ltd, 33(1), pp. 22–26.
- Kana, J. R., Gbemenou, B., Gnonlonfin, J., Harvey, J., Wainaina, J., Wanjuki, I., Skilton, R. A. & Tegua, A. (2013) Mycobiota and toxigenicity profile of *Aspergillus flavus* recovered from food and poultry feed mixtures in Cameroon. *Journal of Animal and Poultry Sciences*, 2(4), pp. 98–107.
- Kanagawa T. (2003). Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 96, 317- 323
- Kang, S. J., Lee, H. M., Park, Y. Il, Yi, H., Lee, H., So, B. J., Song, J. Y. & Kang, H. G. (2016) Chemically induced hepatotoxicity in human stem cell-induced hepatocytes compared with primary hepatocytes and HepG2., *Cell Biology and Toxicology*. *Cell Biology and Toxicology*, 32(5), pp. 403–417.
- Karimi Torshizi, M. A, Moghaddam, R., Rahimi, S. & Mojjani, N. (2010) Assessing the effect of administering probiotics in water or as a feed supplement on broiler performance and immune response., *British poultry science*, 51(2), pp. 178–84.
- Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., Oswald, I. P., Speijers, G., Chiodini, A., Recker, T. & Dussort, P. (2016) Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination., *Mycotoxin Research*, pp. 179–205.
- Karovičová, J. & Kohajdová, Z. (2003) Lactic acid fermented vegetable juices., *Horticultura Science*, 30(4), pp. 152–158.
- Kendirci, p., & Altug, t. (2004). Carry-over of aflatoxin M1 from milk to kefir and kefir grain. *Milchwissenschaft*, 59(7-8), 399-401.
- Kim, J. S., Ingale, S. L., Kim, Y. W., Kim, K. H., Sen, S., Ryu, M. H., & Chae, B. J. (2012). Effect of supplementation of multi-microbe probiotic product on growth performance, apparent digestibility, cecal microbiota and small intestinal morphology of broilers. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 96(4), pp 618-626.

- Knoop, K. A., McDonald, K. G., Kulkarni, D. H. & Newberry, R. D. (2016) Antibiotics promote inflammation through the translocation of native commensal colonic bacteria., *Gut*, 65(7), pp. 1100–1109.
- Kocić-Tanackov, S. D., & Dimić, G. R. (2013). Antifungal activity of essential oils in the control of food-borne fungi growth and mycotoxin biosynthesis in food., *Metabolism*, 4, 5.
- Kosikowski, F., & Mistry, V. V. (1997). *Cheese and fermented milk foods*. Westport, CT, USA:: FV Kosikowski. Vol. 1, pp. 226-251
- Kotova, I. B., Cherdyntseva, T. A. and Netrusov, A. I. (2016) Russian Kefir Grains Microbial Composition and Its Changes during Production Process., in, pp. 93–121.
- Krebs, H. A., Wiggins, D., Stubbs, M., Sols, A. & Bedoya, F. (1983) Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate., *The Biochemical journal*. Portland Press Ltd, 214(3), pp. 657–63.
- Krzywonos, M., & Eberhard, T. (2011). High density process to cultivate *Lactobacillus plantarum* biomass using wheat stillage and sugar beet molasses. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(2), 6-6.
- Kurtzman, C. P. (2014). Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(2), pp 325-332.
- La Rivière, J.W. & Kooiman, P. (1967) Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Arch Mikrobiol*. 59: 269-278.
- Latgé, J.-P. (2001) The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*., *Trends in Microbiology*, 9(8), pp. 382–389.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A. & Gobbetti, M. (2000) Purification and Characterization of Novel Antifungal Compounds from the Sourdough *Lactobacillus plantarum* Strain 21B., *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), pp. 4084–4090.
- León Peláez, a. M., Serna Cataño, C. a., Quintero Yepes, E. a., Gamba Villarroel, R. R., De Antoni, G. L. & Giannuzzi, L. (2012) Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation., *Food Control*. Elsevier Ltd, 24(1–2), pp. 177–183.
- León Peláez, Á. M. (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.

- León, Peláez, Ángela, M., Montoya, C., Olga, I., Karina, E., Diana, M., Carlos, A., Juan, M., (2006) Bacterias ácido lácticas (BAL) silvestres colombianas presentan propiedades adecuadas para la fabricación de masa ácida. *Vitae*, 13(2), 26-35.)
- Liang, M. J., Wang, Z. P., Xu, L., Leng, L., Wang, S. Z., Luan, P., ... & Li, H. (2015). Estimating the genetic parameters for liver fat traits in broiler lines divergently selected for abdominal fat. *Genetics & Molecular Research*, 14, 9646-9654.
- Lin, C. H., Chen, Y. H., Tsai, T. Y. & Pan, T. M. (2017) Effects of deep sea water and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 on hypercholesterolemia hamsters gut microbiota., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1), pp. 321–329.
- Ling, K. H. (1994) Territrems, Tremorgenic Mycotoxins Isolated from *Aspergillus terreus*., *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 13(3), pp. 243–252.
- Liu, J.-R., Wang, S.-Y., Lin, Y.-Y. & Lin, C.-W. (2002) Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice., *nutrition and cancer*. Lawrence Erlbaum Associates, Inc., 44(2), pp. 183–187.
- Liu, Y., Du, M. & Zhang, G. (2014) Proapoptotic activity of aflatoxin B1 and sterigmatocystin in HepG2 cells., *Toxicology reports*. 1, pp. 1076–1086.
- Lombardi, A. M., Bevilacqua A. E. & Califano, A. N. (1994) Variation in organic acids content during ripening of Reggiano cheese in air-tight sealed bags. *Food Chemistry* 51 pp 221–226
- 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) Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas
- Londero, A., Hamet, M. F., De Antoni, G. L., Garrote, G. L. & Abraham, A. G. (2012) Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterisation., *The Journal of dairy research*, 79(3), pp. 262–71.
- Londero, A., Iraporda, C., Garrote, G. L. & Abraham, A. G. (2015) Cheese whey fermented with kefir micro-organisms: Antagonism against *Salmonella* and immunomodulatory capacity., *International Journal of Dairy Technology*, 68(1), pp. 118–126.
- Londero, A., León Peláez, M. A., Diosma, G., De Antoni, G. L., Abraham, A. G. & Garrote, G. L. (2014) Fermented whey as poultry feed additive to prevent fungal contamination., *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(15), pp. 3189–3194.
- Lopez-Giacoman, S. & Madero, M. (2015) Biomarkers in chronic kidney disease, from kidney function to kidney damage., *World journal of nephrology*, 4(1), pp. 57–73.

- Lopitz-Otsoa, F. A., Elguezabal, N. & Garaizar, J. (2006) Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities., *Revista Iberoamericana de Micología*, 23, pp. 67-74.
- Lovett, J. (1972) *Toxigenic Fungi from Poultry Feed and Litter.*, Poultry Science. Oxford University Press, 51(1), pp. 309-313.
- Lugauskas, A., Krikstaponis, A. & Sveistyte, L. (2004) Airborne fungi in industrial environments--potential agents of respiratory diseases., *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 11(1), pp. 19-25.
- Luo, G. & Mitchell, T. G. (2002) Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR., *Journal of clinical microbiology. American Society for Microbiology*, 40(8), pp. 2860-5.
- Kabir, S. M. (2009). The role of probiotics in the poultry industry. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(8), 3531-3546.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2017). *Brock biology of microorganisms* (Vol. 13). Pearson.
- Magalhães, K. T., Pereira, G. V. D. M., Campos, C. R., Dragone, G., & Schwan, R. F. (2011). Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2), 693-702.
- Magnani, M., Fernandes, T., Prete, C. E. C., Homechim, M., Ono, E. Y. S., Vilas-Boas, L. A., Sartori, D., Furlaneto, M. C. & Fungaro, M. H. P. (2005) Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans., *Scientia Agricola. Scientia Agricola*, 62(1), pp. 45-49.
- Magnoli, A. P., Monge, M. P., Miazzo, R. D., Cavaglieri, L. R., Magnoli, C. E., Merkis, C. I., Cristofolini, A. L., Dalcero, A. M. & Chiacchiera, S. M. (2011) Effect of low levels of aflatoxin B1 on performance, biochemical parameters, and aflatoxin B1 in broiler liver tissues in the presence of monensin and sodium bentonite., *Poultry Science*. 90(1), pp. 48-58.
- Magnoli, C., Chiacchiera, S., Miazzo, R., Palacio, G., Angeletti, A., Hallak, C. & Dalcero, A. (2002) The mycoflora and toxicity of feedstuffs from a production plant in Córdoba, Argentina., *Mycotoxin Research*. 18(1), pp. 7-22.
- Marino, S., Staines, K. A., Brown, G., Howard-Jones, R. A. & Adamczyk, M. (2016) Models of ex vivo explant cultures: applications in bone research., *BoneKEy Reports*, p 5.
- Martínez-Romero, D., Bailén, G., Serrano, M., Guillén, F., Valverde, J. M., Zapata, P., Castillo, S. and Valero, D. (2007) Tools to maintain postharvest fruit and vegetable quality

- through the inhibition of ethylene action: A review., *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(6), pp. 543–560.
- Massey, T. E., Stewart, R. K., Daniels, J. M. & Liu, L. (1995) Biochemical and Molecular Aspects of Mammalian Susceptibility to Aflatoxin B1 Carcinogenicity., *Experimental Biology and Medicine*, 208(3), pp. 213–227.
- McKean, C., Tang, L., Tang, M., Billam, M., Wang, Z., Theodorakis, C. W., ... & Wang, J. S. (2006). Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in animals and human cells. *Food and Chemical Toxicology*, 44(6), 868-876.
- Medrano, M., Hamet, M. F., Abraham, A. G., & Pérez, P. F. (2009). Kefiran protects Caco-2 cells from cytopathic effects induced by *Bacillus cereus* infection., *Antonie Van Leeuwenhoek*, 96(4), 505-9.
- Medrano, M., Pérez, P. F. & Abraham, A. G. (2008) Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors., *International journal of food microbiology*, 122(1–2), pp. 1–7.
- Mendonca Jr, C. X., & Jensen, L. S. (1983). Regression equations for estimating hepatic lipid content of chicks and hens by moisture determination. *Poultry science*, 62(10), pp. 2120-2122.
- Meronuck, R. (1987). The Significance of Fungi. *Plant Dis*, 71, 287.
- Miazzo, R., Peralta, M. F., Magnoli, C., Salvano, M., Ferrero, S., Chiacchiera, S. M., Carvalho, E. C. Q., Rosa, C. A. R. & Dalcero, A. (2005) Efficacy of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin., *Poultry Science*, 84(1), pp. 1–8.
- Milus, E. (1994) Evaluation of Foliar Fungicides for Controlling *Fusarium* Head Blight of Wheat., *Plant Disease*, p. 697.
- Mohan, B., Kadirvel, R., Bhaskaran, M., & Natarajan, A. (1995). Effect of probiotic supplementation on serum/yolk cholesterol and on egg shell thickness in layers. *British Poultry Science*, 36(5), 799-803.
- Molina, M., & Giannuzzi L. (1999). Combined Effect of Temperature and Propionic Acid Concentration on the Growth of *Aspergillus parasiticus*., *Food Research International* 32 (10): 677–82.
- Monge, M. del P., Magnoli, C. E. & Chiacchiera, S. M. (2012) Survey of *Aspergillus* and *Fusarium* species and their mycotoxins in raw materials and poultry feeds from Córdoba, Argentina., *Mycotoxin Research*. 28(2), pp. 111–122.

- Monson, M. S., Settlage, R. E., McMahon, K. W., Mendoza, K. M., Rawal, S., El-Nezami, H. S., ... & Reed, K. M. (2014). Response of the hepatic transcriptome to aflatoxin B1 in domestic turkey (*Meleagris gallopavo*). *Plos one*, 9(6), e100930.
- Moss, M. O. (1991). The environmental factors controlling mycotoxin formation. *Mycotoxins and animal foods*, 37-56.
- Müller, G., Kielstein, P., Rosner, H., Berndt, A., Heller, M. & Köhler, H. (1999) Studies on the influence of combined administration of ochratoxin A, fumonisin B1, deoxynivalenol and T2 toxin on immune and defence reactions in weaner pigs., *Mycoses*, 42(7-8), pp. 485-493.
- Munir, M. T., Rehman, Z. U., Shah, M. A., & Umar, S. (2017). Interactions of *Aspergillus fumigatus* with the respiratory system in poultry. *World s Poultry Science Journal*, 73(2), 321-336.
- Murima, P., McKinney, J. D. & Pethe, K. (2014) Targeting Bacterial Central Metabolism for Drug Development., *Chemistry & Biology*. Cell Press, 21(11), pp. 1423-1432.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 59(3), 695-700.
- Nahar, K., Gupta, N., Gauvin, R., Absar, S., Patel, B., Gupta, V., Khademhosseini, A. & Ahsan, F. (2013) In vitro, in vivo and ex vivo models for studying particle deposition and drug absorption of inhaled pharmaceuticals., *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(5), pp. 805-818.
- Norred, W. P., Voss, K. A., Bacon, C. W. & Riley, R. T. (1991) Effectiveness of ammonia treatment in detoxification of fumonisin-contaminated corn., *Food and Chemical Toxicology*. Pergamon, 29(12), pp. 815-819.
- Nunes, R. V., Scherer, C., Pozza, P. C., Eyng, C., Bruno, L. D. G., & Vieites, F. M. (2012). Use of probiotics to replace antibiotics for broilers. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(10), pp 2219-2224.
- Oakley, B. B., Lillehoj, H. S., Kogut, M. H., Kim, W. K., Maurer, J. J., Pedroso, A., Lee, M. D., Collett, S. R., Johnson, T. J. & Cox, N. A. (2014) The chicken gastrointestinal microbiome., *FEMS Microbiology Letters*, 360(2), pp. 100-112.
- Oláh, I., Nagy, N. & Vervelde, L. (2013) Structure of the avian lymphoid system., *Avian Immunology: Second Edition*, pp. 11-44.

- Oliver, W. T., Miles, J. R., Diaz, D. E., Dibner, J. J., Rottinghaus, G. E. & Harrell, R. J. (2012) Zearalenone enhances reproductive tract development, but does not alter skeletal muscle signaling in prepubertal gilts., *Animal Feed Science and Technology*, 174(1-2), pp. 79-85.
- Olnood, C. G., Beski, S. S. M., Iji, P. a. & Choct, M. (2015) Delivery routes for probiotics: Effects on bird performance, intestinal morphology and gut microflora., *Animal Nutrition*, 1, pp. 192-202.
- OMS (1992) Who seminar pack for drinking-water quality Water Treatment http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/S12.pdf?ua=1
- Onilude, a a, Fagade, O. E., Bello, M. M. & Fadahunsi, I. F. (2005) Inhibition of aflatoxin-producing aspergilli by lactic acid bacteria isolates from indigenously fermented cereal gruels., *Journal of Biotechnology*, 4, pp. 1404-1408.
- Orawan, C. & Aengwanich, W. (2007) Blood cell characteristics, hematological values and average daily gained weight of Thai indigenous, Thai indigenous crossbred and broiler chickens., *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(2), pp. 302-309.
- Palazzini, J. M., Groenenboom-de Haas, B. H., Torres, A. M., Köhl, J. & Chulze, S. N. (2013) Biocontrol and population dynamics of fusarium spp. On wheat stubble in argentina, *Plant Pathology*, 62(4), pp. 859-866.
- Panda, A. K., Reddy, M. R. & Praharaj, N. K. (2001) Dietary supplementation of probiotic on growth, serum cholesterol and gut microflora of broilers., *Indian Journal of Animal Sciences*, 71(5), pp. 488-490.
- Panorama Agricola Semanal 22 febrero (2018) Bolsa de Cereales. Departamento de estimaciones Agrícolas <http://www.bolsadecereales.com/pas>.
- Patnaik, R. & Padhy, R. N. (2016) Evaluation of geno-toxicity of methyl parathion and chlorpyrifos to human liver carcinoma cell line (HepG2)., *Environmental Science and Pollution Research*, 23(9), pp. 8492-8499.
- Patterson, J. & Burkholder, K. (2003) Application of prebiotics and probiotics in poultry production., *Poultry Science*, 82(4), pp. 627-631.
- Pedroso, A. A., Hurley-Bacon, A. L., Zedek, A. S., Kwan, T. W., Jordan, A. P. O., Avellaneda, G., Hofacre, C. L., Oakley, B. B., Collett, S. R., Maurer, J. J. & Lee, M. D. (2013) Can probiotics improve the environmental microbiome and resistome of commercial poultry production?., *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(10), pp. 4534-4559.

- Peltonen, K., H. El-Nezami, C. Haskard, J. Ahokas, & S. Salminen. 2001. Aflatoxin B1 Binding by Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria., *Journal of Dairy Science* 84 (10): 2152–56.
- Perdigón, G., Fuller, R. & Raya, R. (2001) Lactic acid bacteria and their effect on the immune system., *Current issues in intestinal microbiology*, 2(1), pp. 27–42.
- Pereira, P., Nesci, A. & Etcheverry, M. (2007) Effects of biocontrol agents on *Fusarium verticillioides* count and fumonisin content in the maize agroecosystem: Impact on rhizospheric bacterial and fungal groups., *Biological Control. Academic* 42(3), pp. 281–287.
- Perelman, B. & Kuttin, E. S. (1992) Aspergillosis in ostriches., *Avian Pathology. Taylor & Francis Group*, 21(1), pp. 159–163.
- Perrone, G., & Gallo, A. (2017). *Aspergillus* species and their associated mycotoxins. In *Mycotoxigenic Fungi* (pp. 33-49). Humana Press, New York, NY.
- Perry, M. J., Makins, J. F., Adlard, M. W. & Holt, G. (1984) Aspergillic acids produced by mixed cultures of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus nidulans*., *Journal of general microbiology*, 130(2), pp. 319–323.
- Peterson, S. W. (2008) Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci., *Mycologia*, 100(2), pp. 205–226.
- Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R. & Waddell, J. (2003) Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Oxford University Press*, 53(1), pp. 28–52.
- Pierides, M., El-nezami, H., Peltonen, K., Salminen, S. & Ahokas, J. (2000) Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M1 in a food model., *Journal of Food Protection. International Association for Food Protection*, 63(5), pp. 645–650.
- Piermaria, J. A., Pinotti, A., Garcia, M. A. & Abraham, A. G. (2009) Films based on kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization., *Food Hydrocolloids*, 23(3), pp. 684–690.
- Pildain, M. B., Frisvad, J. C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J. & Samson, R. A. (2008) Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, pp. 725–735.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). The ecology of fungal food spoilage. In *Fungi and food spoilage* (pp. 3-9). Springer, Boston, MA.

- Porro, D., Bianchi, M. M., Brambilla, L., Menghini, R., Bolzani, D., Carrera, V., ... & Alberghina, L. (1999). Replacement of a metabolic pathway for large-scale production of lactic acid from engineered yeasts. *Applied & environmental microbiology*, 65(9), 4211-4215.
- Poultry Performance Plus (2017). European Broiler Index or European Production Efficiency Factor. <http://poultryperformanceplus.com/information-database/broilers/285-european-broiler-index-or-european-production-efficiency-factor> Accessed 07.29.17
- Prado, M. R., Blandón, L. M., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C., Castro, G. R., Thomaz-Soccol, V. & Soccol, C. R. (2015) Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products., *Frontiers in Microbiology*. 6, p. 1177.
- Pramela, Mary, Priya R Iyer, & Lakshmi Ts. 2017. Anti-Microbial, Anti-Fungal and Anti-Carcinogenic Properties of Coconut Milk Kefir.” *International Journal of Home Science IJHS* 3 (31): 365–69.
- Prazeres, A. R., Carvalho, F. & Rivas, J. (2012) Cheese whey management: A review., *Journal of Environmental Management*, pp. 48–68.
- Pundir, R. K., & Jain, P. (2010). Screening for antifungal activity of commercially available chemical food preservatives. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 5, 25-7.
- Quinto, E. J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J. & Girbés, T. (2014) Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review., *Food and Nutrition Sciences*, 5(18), pp. 1765–1775.
- Rastogi, S., Dogra, R. K. S., Khanna, S. K. & Das, M. (2006) Skin tumorigenic potential of aflatoxin B1 in mice., *Food and Chemical Toxicology*, 44(5), pp. 670–677.
- Rastogi, S., Dwivedi, P. D., Khanna, S. K. & Das, M. (2004) Detection of Aflatoxin M1 contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA., *Food Control*. 15(4), pp. 287–290.
- Rattanachaikunsopon, P. & Phumkhachorn, P. (2010) Lactic Acid Bacteria: Their Antimicrobial Compounds and Their Uses in Food Production., *Annals of Biological Research*, 1(4), pp. 218–228.
- Reddy, L., Odhav, B. & Bhoola, K. (2006) Aflatoxin B1-induced toxicity in HepG2 cells inhibited by carotenoids: morphology, apoptosis and DNA damage., *Biological Chemistry*, 387(1), pp. 87–93.
- Reed, C., Doyungan, S., Ioerger, B. & Getchell, A. (2007) Response of storage molds to different initial moisture contents of maize (corn) stored at 25 °C, and effect on respiration rate and nutrient composition., *Journal of Stored Products Research*. Pergamon, 43(4), pp. 443–458.

- Reitman, S., & Frankel, S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American journal of clinical pathology*, 28(1), 56-63.
- Repetto, M. (1995) *Toxicología avanzada*. Eds. Díaz de Santos.
- Requena, F., Saume, E., & León, A. (2005). Micotoxinas: Riesgos y prevención. *Zootecnia Tropical*, 23(4), pp 393-410.
- Richard, J. L., Payne, G. A., Desjardins, A. E., Maragos, C., Norred, W. P., & Pestka, J. J. (2003). Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. CAST Task Force Report, 139, 101-103.
- Ricke, S. C. (2003). Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science*, 82(4), 632-639.
- Rimada, P. S. & Abraham, A. G. (2001) Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation., *Journal of Dairy Research.*, 68(4), pp. 653-661.
- Rinttilä, T., & Apajalahti, J. (2013). Intestinal microbiota and metabolites—Implications for broiler chicken health and performance¹. *Journal of Applied Poultry Research*, 22(3), 647-658.
- Robert, H., Payros, D., Pinton, P., Théodorou, V., Mercier-Bonin, M. & Oswald, I. P. (2017) Impact of mycotoxins on the intestine: are mucus and microbiota new targets?., *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 20(5), pp. 249-275.
- Roda, E., Coccini, T., Acerbi, D., Castoldi, A. F. & Manzo, L. (2010) Comparative in vitro and ex-vivo myelotoxicity of aflatoxins B1 and M1 on haematopoietic progenitors (BFU-E, CFU-E, and CFU-GM): Species-related susceptibility., *Toxicology in Vitro*, 24(1), pp. 217-223.
- Rodríguez-Pazo, N., da Silva Sabo, S., Salgado-Seara, J. M., Arni, S. Al, de Souza Oliveira, R. P. & Domínguez, J. M. (2016) Optimisation of cheese whey enzymatic hydrolysis and further continuous production of antimicrobial extracts by *Lactobacillus plantarum* CECT-221., *Journal of Dairy Research.*, 83(3), pp. 402-411.
- Rondón, A. J., Samaniego, L. M., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Ranilla, M. J., Laurencio, M. & Pérez, M. (2008) Isolation, identification and partial characterization of the probiotic properties of *Lactobacillus* sp. strains obtained from the gastrointestinal tract of broilers., *Ciencia y Tecnología Alimentaria.*, 6(1), pp. 56-63.

- Ros, E. (2000) Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk., *Atherosclerosis*, pp. 357–379.
- Rosa, C. A. R., Miazzo, R., Magnoli, C., Salvano, M., Chiacchiera, S. M., Ferrero, S., Saenz, M., Carvalho, E. C. Q. & Dalcerro, A. (2001) Evaluation of the efficacy of bentonite from the south of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers., *Poultry Science*, pp. 139–144.
- Rosado A. S., Duarte G. F., Seldin L. & van Elsas J. D. 1998. Genetic diversity of nifH gene sequences in Paenibacillus azotofixans strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR- amplified gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 4:2770–2779.
- Rosmini, M. R., Sequeira, G. J. & Frizzo, L. (2004) Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena., *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 3(January), pp. 181–191.
- Saghaie, L., Pourfarzam, M., Fassihi, A. and Sartippour, B. (2013) Synthesis and tyrosinase inhibitory properties of some novel derivatives of kojic acid., *Research in pharmaceutical sciences. Wolters Kluwer -- Medknow Publications*, 8(4), pp. 233–42.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees., *Molecular Biology and Evolution*. Oxford University Press, 4(4), pp. 406–425.
- Salarmoini, M., & Fooladi, M. H. (2010). Efficacy of Lactobacillus acidophilus as probiotic to improve broiler chicks performance. *Journal of Agricultural Science & Technology*, 13, 165-172. Sharma, R. P. (1993). Immunotoxicity of Mycotoxins1. *Journal of dairy science*, 76(3), 892-897.
- Saleemi, M. K., Zargham Khan, M., Khan, A. & Javed, I. (2010) Mycoflora of poultry feeds and mycotoxins producing potential of Aspergillus species., *Pak. J. Bot*, 42(1), pp. 427–434.
- Salehimanesh, A., Mohammadi, M., & Roostaei-Ali Mehr, M. (2016). Effect of dietary probiotic, prebiotic and synbiotic supplementation on performance, immune responses, intestinal morphology and bacterial populations in broilers. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 100(4), 694-700.
- Salles J. F., De Souza F. A. & van Elsas J. D. 2001. Molecular method to assess the diversity of burkholderia species in environmental samples. *Applied And Environmental Microbiology*. 68,(4) 1595–1603.

- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stamatii, A. & Zucco, F. (2005) The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics., *Cell Biology and Toxicology*. Kluwer Academic Publishers, 21(1), pp. 1–26.
- Samson, R. A., Peterson, S. W., Frisvad, J. C. & Varga, J. (2011) New species in *Aspergillus* section *Terrei*., *Studies in Mycology*, 69, pp. 39–55.
- Sánchez-Torres, C., García-Romo, G. S., Cornejo-Cortés, M. A., Rivas-Carvalho, A., & Sánchez-Schmitz, G. (2001). CD16+ and CD16– human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells. *International Immunology*, 13(12), 1571-1581.
- Sangmanee, P. & Hongpattarakere, T. (2014) Inhibitory of multiple antifungal components produced by *Lactobacillus plantarum* K35 on growth, aflatoxin production and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*., *Food Control*. Elsevier Ltd, 40(1), pp. 224–233.
- Santos, M. I., Araujo-Andrade, C., Esparza-Ibarra, E., Tymczynszyn, E. & Gómez-Zavaglia, A. (2014) Galacto-oligosaccharides and lactulose as protectants against desiccation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*., *Biotechnology Progress*, 30(5), pp. 1231–1238.
- Sathe, S. J., Nawani, N. N., Dhakephalkar, P. K. & Kapadnis, B. P. (2007) Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables., *Journal of Applied Microbiology*. 103(6), pp. 2622–2628.
- Sauter, E. A., Petersen, C. F., Steele, E. E., Parkinson, J. F., Dixon, J. E. & Stroh, R. C. (1981) The Airborne Microflora of Poultry Houses., *Poultry Science*, 60(3), pp. 569–574.
- Schenker, M. B., Christiani, D., Cormier, Y., Dimich-Ward, H., Doekes, G., Dosman, J., & Heederik, D. (1998). Respiratory health hazards in agriculture. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 158 pp 5 II.
- Schiff Jr, P. L. (2006). Ergot and its alkaloids. *American journal of pharmaceutical education*, 70(5),p 98.
- Schlam, D., Canton, J., Carreño, M., Kopinski, H., Freeman, S. A., Grinstein, S., & Fairn, G. D. (2016). Gliotoxin suppresses macrophage immune function by subverting phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate homeostasis. *Mbio*, 7(2), e02242-15.
- Schneitz, C. (2005) Competitive exclusion in poultry – 30 years of research., *Food Control*, 16, pp. 657–667.

- Schnürer, J. & Magnusson, J. (2005) Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives., *Trends in Food Science & Technology*. 16(1-3), pp. 70-78.
- Secretaria de Agricultura, G. y P. (2017) Boletín Avícola.
- Sell, S. (2003). Mouse models to study the interaction of risk factors for human liver cancer. *Cancer research*, 63(22), 7553-7562.
- Serrano, M., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valverde, J. M., Zapata, P. J., Castillo, S. & Valero, D. (2008) The addition of essential oils to MAP as a tool to maintain the overall quality of fruits., *Trends in Food Science and Technology*, 19(9), pp. 464-471.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) Produccion primaria (2018) <http://www.senasa.gob.ar/cadena-animal/aves/produccion-primaria>
- Sharma, R. A. & Farmer, P. B. (2004) Biological relevance of adduct detection to the chemoprevention of cancer., *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 10(15), pp. 4901-4912.
- Sheikh-Ali, S. I., Ahmad, A., Mohd-Setapar, S.-H., Zakaria, Z. A., Abdul-Talib, N., Khamis, A. K. & Hoque, M. E. (2014) The potential hazards of *Aspergillus* sp. in foods and feeds, and the role of biological treatment: a review., *Journal of microbiology*, 52(10), pp. 807-818.
- Sherwin, C. M., Christiansen, S. B., Duncan, I. J., Erhard, H. W., Lay, D. C., Mench, J. A., O Connor, C. E. & Carol Petherick, J. (2003) Guidelines for the ethical use of animals in applied ethology studies., *Applied Animal Behaviour Science*, pp. 291-305.
- Shetty, P. H., & Jespersen, L. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science & Technology*, 17(2), pp 48-55.
- Shokri, H. (2016) Investigation on mycoflora of poultry breeding houses air and studying the efficacy of spraying and fumigation on inactivating the airspora., *Iranian Journal of Veterinary Medicine*. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 10(1), pp. 19-26.
- Shuaib, F. M. B., Ehiri, J., Abdullahi, A., Williams, J. H. & Jolly, P. E. (2010) Reproductive health effects of aflatoxins: A review of the literature., *Reproductive Toxicology*, 29(3), pp. 262-270.
- Simaraks, S., Chinrasri, O., & Aengwanich, W. (2004). Hematological, electrolyte and serum biochemical values of the Thai indigenous chickens (*Gallus domesticus*) in

- northeastern, Thailand. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(3), 425-430.
- Simon-Nobbe, B., Denk, U., Pöll, V., Rid, R. & Breitenbach, M. (2008) The spectrum of fungal allergy., *International Archives of Allergy and Immunology*, 145(1), pp. 58–86.
- Singh, B. K., Park, S. H., Lee, H.-B., Goo, Y.-A., Kim, H. S., Cho, S. H., Lee, J. H., Ahn, G. W., Kim, J. P., Kang, S. M. & Kim, E.-K. (2016) Kojic Acid Peptide: A New Compound with Anti-Tyrosinase Potential., *Annals of Dermatology*, 28(5), p. 555.
- Sjögren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnürer, J. & Kenne, L. (2003) Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14., *Applied and environmental microbiology. American Society for Microbiology*, 69(12), pp. 7554–7.
- Skóra, J., Matusiak, K., Wojewoźdzki, P., Nowak, A., Sulyok, M., Ligocka, A., Okrasa, M., Hermann, J. & Gutarowska, B. (2016) Evaluation of microbiological and chemical contaminants in poultry farms., *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(2), pp. 1–16.
- Śliżewska, K. & Piotrowska, M. (2014) Reduction of Ochratoxin A in Chicken Feed Using Probiotic., *Annals of Agricultural and Environmental Medicine. Institute of Rural Health*, 21(4), pp. 676–680.
- Song, M., Kim, N., Lee, S. & Hwang, S. (2007) Use of Whey Permeate for Cultivating *Ganoderma lucidum* Mycelia., *Journal of Dairy Science*, 90(5), pp. 2141–2146.
- Spalatel, C. (2012) Biotechnological valorisation of cheese whey., *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 10(March), pp. 1–8.
- Spanemberg, A., Ferreiro, L., Machado, G., Fraga, C. F., Araujo, R., Spanemberg, A., Ferreiro, L., Machado, G., Fraga, C. F. & Araujo, R. (2016) Identification and characterization of *Aspergillus fumigatus* isolates from broilers., *Pesquisa Veterinária Brasileira. Colégio Brasileiro de Patologia Animal*, 36(7), pp. 591–594.
- 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
- Srour, A. Y., Fakhoury, A. M., & Brown, R. L. (2017). Targeting aflatoxin biosynthetic genes. In *Mycotoxigenic Fungi* (pp. 159-171). Humana Press, New York, NY.
- Stark, A. A. (2001). Mechanisms of action of aflatoxin B1 at the biochemical and molecular levels In *Microbial Food Contamination* pp 47-60
- Stiles, M. E. (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria., *Antonie van Leeuwenhoek. Kluwer Academic Publishers*, 70(2–4), pp. 331–345.

- Stoddart, M. J. (2011) *Cell Viability Assays: Introduction.*, Humana Press, pp. 1–6.
- Su, M., Yu, T., Zhang, H., Wu, Y., Wang, X. & Li, G. (2016) The Antiapoptosis Effect of Glycyrrhizate on HepG2 Cells Induced by Hydrogen Peroxide., *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi, 2016, pp. 1–9.
- Suzuki M. T. & Giovannoni S. J. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 625-630
- Sweeney, M. J. & Dobson, A. D. (1999) *Molecular biology of mycotoxin biosynthesis.*, FEMS Microbiology Letters, 175(2), pp. 149–163.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A. & Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0., *Molecular Biology and Evolution*. Oxford University Press, 30(12), pp. 2725–2729..
- Tellez, G., Latorre, J. D., Kuttappan, V. A., Hargis, B. M. & Hernandez-Velasco, X. (2015) Rye Affects Bacterial Translocation, Intestinal Viscosity, Microbiota Composition and Bone Mineralization in Turkey Poults., *PLOS ONE*. Edited by T. L. Weir. Public Library of Science, 10(4), p. e0122390.
- Tennant, B. C. & Center, S. A. (2008) *Hepatic Function.*, *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, pp. 379–412.
- Thyagaraja, N. & Hosono, A. (1994) Binding properties of lactic acid bacteria from “Idly” towards food-borne mutagens., *Food and Chemical Toxicology*, 32(9), pp. 805–809.
- Toghyani, M., Mosavi, S. kazem, Modaresi, M. and Landy, N. (2015) Evaluation of kefir as a potential probiotic on growth performance, serum biochemistry and immune responses in broiler chicks., *Animal Nutrition*, 1(4), pp. 305–309.
- Torres, A. M., Barros, G. G., Palacios, S. A., Chulze, S. N. & Battilani, P. (2014) Review on pre- and post-harvest management of peanuts to minimize aflatoxin contamination., *Food Research International*, pp. 11–19.
- Trabelsi, I., Ktari, N., Ben Slima, S., Bouchaala, K. & Ben Salah, R. (2016) Effects of supplementation with *L. plantarum* TN8 encapsulated in alginate-chitosan in broiler chickens., *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 89, pp. 677–681.
- Trejo FM, Minnaard J, Pérez PF, De Antoni GL. (2006) Inhibition of *Clostridium difficile* growth and adhesion to enterocytes by *Bifidobacterium* supernatants. *Anaerobe*, 12. pp. 186-193

- Troxel, C. M., Reddy, a P., O Neal, P. E., Hendricks, J. D. & Bailey, G. S. (1997) In vivo aflatoxin B1 metabolism and hepatic DNA adduction in zebrafish (*Danio rerio*).., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 143(1), pp. 213–20.
- Tudzynski, P., Hölter, K., Correia, T., Arntz, C., Grammel, N. & Keller, U. (1999) Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*., *Molecular and General Genetics*, 261(1), pp. 133–141.
- Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E. & Salminen, S. (2001) Quality assurance criteria for probiotic bacteria., *The American journal of clinical nutrition*, 73(2 Suppl), p. 393S–398S.
- Urrego Novoa, J. R., & Díaz, G. J. (2006). Aflatoxins and its mechanisms of toxicity in hepatic cancer. *Revista de la Facultad de Medicina*, 54(2), 108-116.
- Urrego Novoa, José R & Díaz, Gonzalo J (2015) Aflatoxins and its mechanisms of toxicity in hepatic cancer., *Revista Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia*, 54(2), pp. 108–116.
- Vaamonde, G. M. (1996). En: *Toxicología de los alimentos*. Editorial Hemisferio Sur. Argentina.
- Valerio, F., De Bellis, P., Lonigro, S. L., Visconti, A. & Lavermicocca, P. (2008) Use of *Lactobacillus plantarum* fermentation products in bread-making to prevent *Bacillus subtilis* ropy spoilage., *International Journal of Food Microbiology*, 122(3), pp. 328–332.
- Valerio, F., Di Biase, M., Lattanzio, V. M. T. & Lavermicocca, P. (2016) Improvement of the antifungal activity of lactic acid bacteria by addition to the growth medium of phenylpyruvic acid, a precursor of phenyllactic acid., *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 222, pp. 1–7.
- van Veen, L., Dwars, R. M. & Fabri, T. H. F. (1999) Mycotic spondylitis in broilers caused by *Aspergillus fumigatus* resulting in partial anterior and posterior paralysis., *Avian Pathology*, 28(5), pp. 487–490.
- Varga, J., Juhász, Á., Kevei, F. & Kozakiewicz, Z. (2004) Molecular Diversity of Agriculturally Important *Aspergillus* Species., *European Journal of Plant Pathology*, 110(5/6), pp. 627–640.
- Vedamuthu, E. R. (1982). 6. Fermented milks. *Economic microbiology*.
- Vega, F. E. (2008) Insect pathology and fungal endophytes., *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3), pp. 277–279.

- Vero, S., (2016) Herramientas moleculares para la identificación y caracterización de hongos y levaduras (15 06 2016, Montevideo). Libro de Resúmenes. Universidad de La República, Facultad de Química. Catedra de Microbiología
- Viegas, C., Carolino, E., Malta-Vacas, J., Sabino, R., Viegas, S. & Veríssimo, C. (2012) Fungal contamination of poultry litter: a public health problem., *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 75(22-23), pp. 1341-50.
- Villers, P. (2014). Aflatoxins and safe storage. *Frontiers in microbiology*, 5, p 158.
- Vinderola, C. G., Duarte, J., Thangavel, D., Perdígón, G., Farnworth, E. & Matar, C. (2005) Immunomodulating capacity of kefir., *Journal of Dairy Research*, 72(2), pp. 195-202.
- Wang, L., Luo, Y., Luo, X., Wang, R., Li, Y., Li, Y., Shao, H. and Chen, Z. (2016) Effect of deoxynivalenol detoxification by ozone treatment in wheat grains., *Food Control*, 66, pp. 137-144.
- Wegener, H. C. (2003) Antibiotics in animal feed and their role in resistance development., *Current Opinion in Microbiology*, pp. 439-445.
- Wei, C. I., Huang, T. S., Fernando, S. Y. & Chung, K. T. (1991) Mutagenicity studies of kojic acid., *Toxicology Letters*. Elsevier, 59(1-3), pp. 213-220.
- Wells, J. M. & Spence, J. R. (2014) How to make an intestine., *Development*, 141(4), pp. 752-760.
- Wild, C. P., Hasegawa, R., Barraud, L., Chutimataewin, S., Chapot, B., Ito, N. & Montesano, R. (1996) Aflatoxin-albumin adducts: a basis for comparative carcinogenesis between animals and humans., *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. American Association for Cancer Research, 5(3), pp. 179-189.
- Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M. & Aggarwal, D. (2004) Human aflatoxin in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions., *American Society for Clinical Nutrition*, 80, pp. 1106-1122.
- Witthuhn, R. C., Schoeman, T., & Britz, T. J. (2005). Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal*, 15(4), 383-389.

- Wolford, J. H. & Polin, D. (1972) Lipid accumulation and hemorrhage in livers of laying chickens. A study on fatty liver-hemorrhagic syndrome (FLHS)., *Poultry science*, 51(5), pp. 1707–1713.
- Woolnough, K., Fairs, A., Pashley, C. H. & Wardlaw, A. J. (2015) Allergic fungal airway disease., *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 21(1), pp. 39–47.
- Wu, B., Cui, H., Peng, X., Pan, K., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Wang, X. & Huang, J. (2014) Toxicological effects of dietary nickel chloride on intestinal microbiota., *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Elsevier, 109, pp. 70–76.
- Xavier, M. O., Soares, M. P., Meinerz, A. R. M., Nobre, M. O., Osório, L. G., Silva Filho, R. P. da & Meireles, M. C. A. (2007) Aspergillosis: a limiting factor during recovery of captive magellanic penguins., *Brazilian Journal of Microbiology*. SBM, 38(3), pp. 480–484.
- Yaman, H., Ulukanli, Z., Elmali, M., & Unal, Y. (2006). The effect of a fermented probiotic, the kefir, on intestinal flora of poultry domesticated geese (*Anser anser*). *Revue de médecine vétérinaire*, 157(7), 379-386.
- Yang, E. J. & Chang, H. C. (2010) Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi., *International Journal of Food Microbiology*, 139(1–2), pp. 56–63.
- Yang, J., Bai, F., Zhang, K., Lv, X., Bai, S., Zhao, L., & Zhang, J. (2012). Effects of feeding corn naturally contaminated with AFB1 and AFB2 on performance and aflatoxin residues in broilers. *Czech. J. Anim. Sci*, 57(11), 506-515.
- Yarlagadda, V., Samaddar, S., Paramanandham, K., Shome, B. R. & Haldar, J. (2015) Membrane disruption and enhanced inhibition of cell-wall biosynthesis: A synergistic approach to tackle vancomycin-resistant bacteria., *Angewandte Chemie International Edition* 54(46), pp. 13644–13649.
- Yeo, J. & Kim, K. I. (1997) Effect of feeding diets containing an antibiotic, a probiotic, or yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks., *Poultry science*, 76(2), pp. 381–5.
- Yiannikouris, A., & Jouany, J. P. (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research*, 51(2), 81-99.
- Yousofshahi, M., Manteiga, S., Wu, C., Lee, K. & Hassoun, S. (2015) Proximal: a method for Prediction of xenobiotic metabolism., *BMC Systems Biology*. *BMC Systems Biology*, 9(1), p. 94.

- Yu, J., Cleveland, T. E., Nierman, W. C. & Bennett, J. W. (2005) *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. *Revista Iberoamericana de Micología*. 22(4), pp. 194–202.
- Zachos, N. C. (2016) *Gastrointestinal Physiology & Pathophysiology*, in *Viral Gastroenteritis: Molecular Epidemiology and Pathogenesis*, pp. 1–21.
- Zakhia-Rozis, N., & Schorr-Galindo, S. (2013). Les mycotoxines: quelles réponses de la recherche à cette problématique. *Cahiers Agricultures*, 22(3), pp 149-150.
- Zhang, Z. F., & Kim, I. H. (2014). Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers. *Poultry science*, 93(2), 364-370.
- Ziółkowska, G., Tokarzewski, S. & Nowakiewicz, A. (2014) Drug resistance of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from flocks of domestic geese in Poland., *Poultry Science*, 93(5), pp. 1106–1112.
- Zohri, A.-N., Aboul-Nasr, M. B., Adam, M., Mustafa, M. A. & Amer, E. M. (2017) Impact of Enzymes and Toxins Potentiality of Four *Aspergillus* Species to Cause Aspergillosis., *Biology and Medicine*, 9(5), pp. 1–7.
- Zulkifli, I., Abdullah, N., Azrin, N. M. & Ho, Y. W. (2000) Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing *Lactobacillus* cultures and oxytetracycline under heat stress conditions Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets contai., *British poultry science*, (January 2015), pp. 593–597.

Anexos

Anexo 1: Medios de Cultivo

Medios de Cultivo

- **Agar Agua para conservación de conidios**

Agar	0,2%
Agua destilada	99,8%
Se agrega 1 ml o 2 ml a cada CRIOVIAL Una vez los crioviales tienen agregado el medio de cultivo y las placas con los hongos bien esporulados, se toma una buena cantidad de conidias con un ansa ojal, depositándola en el criovial. Luego se conservan en heladera (no Freezer).	

- **Agar Malta**

Extracto de malta	0,1 g/l
Extracto de levadura	0,2 g/l
Agar	0,2 g/l
Agua destilada	1 l
pH final= 7,0 - 7,5	

- **Agar Malta Blando**

Extracto de malta	2%
Agar	0,7%

- **Agar Malta Modificado**

Extracto de malta (Merck®, Darmstadt, Alemania)	1%
Extracto de levadura (Biokar®)	2%
Agar agar (Merck®, Darmstadt, Alemania)	1%
Autoclavar a 121°C	

▪ Agar Papa - Dextrosa

Infusión de papa (200 g de papa)	4,0%
D (+) glucosa	2%
Agar	1,5%

▪ Medio YES

Extracto de levadura	2%
Sacarosa	15%
pH final= 7,0 - 7,5	

Soluciones**▪ Solución de Dilución de Esporas**

Lauril sulfato de sodio (Merck®, Darmstadt, Alemania)	0,01%
Solución de glucosa (Carlo Erba®, Milán, Italia)	1%

Anexo 2

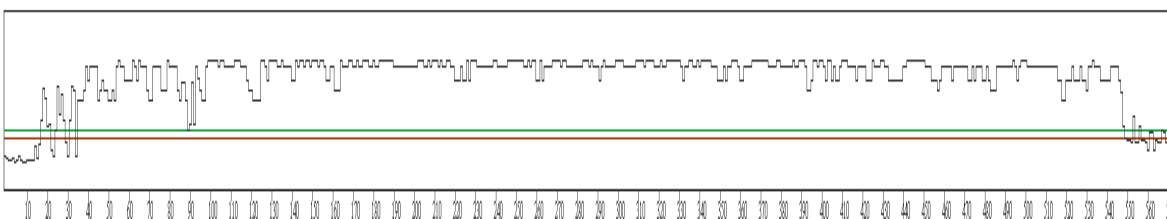
Secuencias ITS1-5,8SrDNA-ITS2 y Gráficos de Calidad de Hongos aislados de ambiente de cría de pollos.

1. *Aspergillus fumigatus* (I3)

Secuencia ITS1- 5,8SrDNA-ITS2 de *A. fumigatus*:

CTATCGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTTTCGACGGCCCGGGGAGGCCTTGCGCCCCGGGCC
 GCGCCCGCCGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATGCAGTCTGAGTTGATTATCGTAATCAGT
 TAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATG
 TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCAT
 GCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCCTCTCCGGGGGA
 CGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCACC GCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCTGCTCTGTAG
 GCCCGGCCGGCGCCAGCCGACACCCAACCTTATTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG
 CT

Gráfico de calidad de la secuencia de *Aspergillus fumigatus*.

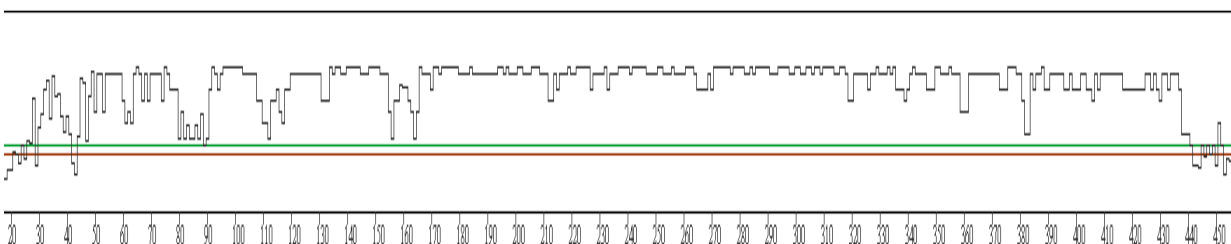


2. *Aspergillus fumigatus*. (I4).

Secuencia ITS1- 5,8SrDNA-ITS2 de *A. fumigatus*:

TAAAGTTGGGTGTCGGCTGGCGCCGGCCGGGCCTACAGAGCAGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACC
 GGACGCGGTGCCCGCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCGGGAGAGGGGGACGGGGGCCCAACACACAAGCC
 GTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCA
 AAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGC
 CGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTAACTGATTACGATAATCAACTCAGACTGCATACTTTCAG
 AACAGCGTTCATGTTGGGGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCGG

Gráfico de calidad de la secuencia de *Aspergillus fumigatus* I4

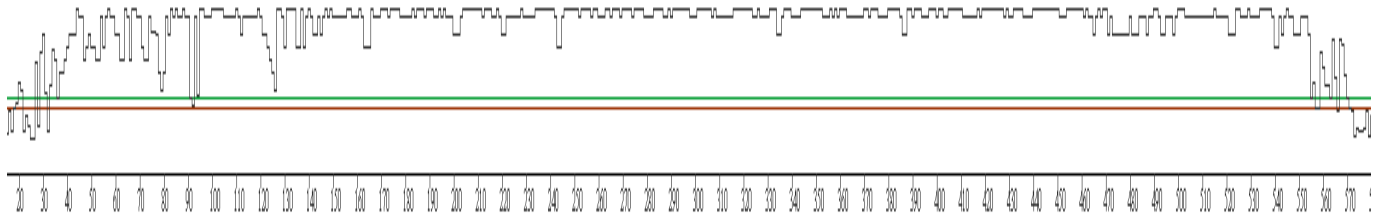


3. *Aspergillus fumigatus* (I12).

Secuencia ITS1- 5,8SrDNA-ITS2 de *A. fumigatus*.

GGGAGGCCTTGCGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATGCAG
TCTGAGTTGATTATCGTAATCAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAA
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTG
CGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTG
GGCCCCCGTCCCCCTCTCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTA
TGGGGCTTTGTCACCTGCTCTGTAGGCCCGGCCGCGCCAGCCGACACCCAACCTTATTTTTCTAAGGTTG
ACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGGCGGGAGGAAACATTACCGAGT
GAGGG

Gráficos de calidad de la secuencia de *A. fumigatus*.

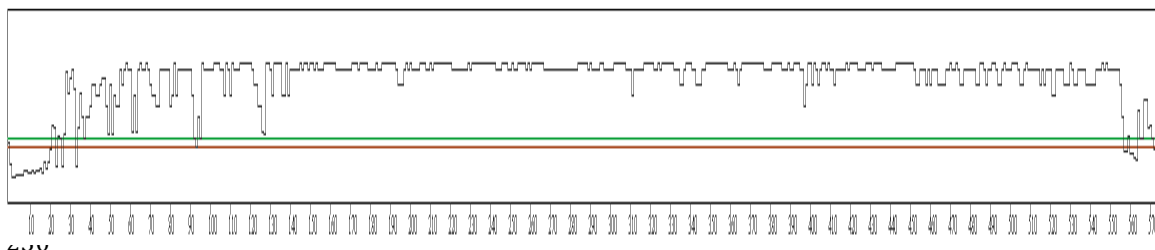


4. *Aspergillus fumigatus*. (I37).

Secuencia ITS1- 5,8SrDNA-ITS2 de *A. fumigatus* I37

GTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTTTCGACGGCCCGGGGAGGCCTTGCGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCGAA
GACCCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATGCAGTCTGAGTTGATTATCGTAATCAGTTAAAACCTTCA
ACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA
ATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAG
CGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCCTCTCCCGGGGGACGGGCCCGAAA
GGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCTGCTCTGTAGGCCCGGCCGCG
GCCAGCCGACACCCAACCTTATTTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAG
CATAT

Gráficos de calidad de la secuencia de *A. fumigatus* I37

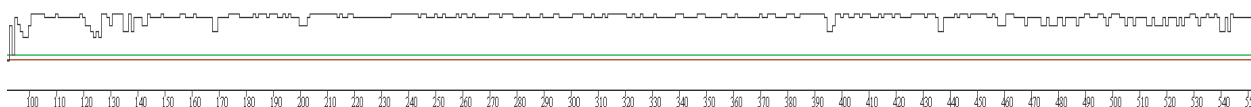


5. *Aspergillus terreus*. (I6)

Secuencia ITS1- 5,8SrDNA-ITS2 de *A. terreus* I6

```
CTTCGGCGGGCCCGCCAGCGTTGCTGGCCGCCGGGGGGCGACTCGCCCCGGGCCCCGTGCCCGCCGGAGACC  
CCAACATGAACCCTGTTCTGAAAGCTTGCAGTCTGAGTTGTGATTCTTTGCAATCAGTTAAAACCTTCAAC  
AATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAAT  
TCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCG  
TCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCTCGTCCCCGGGCTCCCGGGGGACGGGCCCGAAAG  
GCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCTTCCGCTCCGTAGGCCCGGCCGGCGC  
CCGCCGACGCATTTTTTTTGCAACTTGTTTTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAA  
CTTAAGCATATCAAAGGCGGGAGGAAACCGAGTGCGGGGTCTTTATGGCCAACTCCACCG
```

Gráficos de calidad de la secuencia de *A. terreus* I6

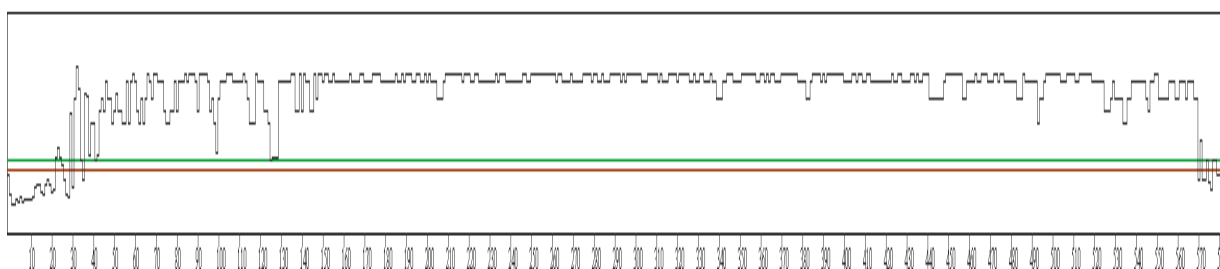


1. *Aspergillus minisclerotigenes*. (I5)

Secuencia ITS1- 5,8SrDNA-ITS2 de *A. minisclerotigenes* I5

```
GTGTGAATTGCAGAATTC CGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGG  
CATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTTCGTCGTCCCCTCTCCGGG  
GGGGACGGGGCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTC  
TGTAGCCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA  
CCCGCTGAACTTAAGC
```

Gráficos de calidad de la secuencia de *A. minisclerotigenes* I5



Anexo 3



La Plata, 22 de Febrero de 2017

It is hereby certified that the Institutional Animal Care and Use Committee of the Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata dependence, has reviewed the protocol and procedure for the care and use of laboratory animals entitled "**Study of probiotic activity of microorganisms of kéfir in the breeding of broilers chickens**" and submitted by Graciela Liliana De Antoni (Marina Golowczyc as alternative researcher). This Committee has found that the above procedures are in agreement with local guidelines for vertebrate animal welfare as well as with US Public Health Service and/or European Union policy on this matter (National Research Council, National Academy Press, Washington DC, 2010, and/or European Union Directive for Animal Experiments 2010/63/EU).

The above project is approved, effective on the above date.

Protocol Number 010-01-15

Se deja constancia que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata evaluó el protocolo de utilización de animales presentado por Graciela Liliana De Antoni (Marina Golowczyc como responsable alterno), titulado "**Estudio de la actividad probiotica de los microorganismos del kefir en la crianza de pollos parrilleros**". Este comité considera que el mencionado protocolo se ajusta a las normas éticas de tratamiento humanitario locales e internacionales que deben aplicarse a los animales vertebrados que se utilizan en investigación biomédica y por tanto lo aprueba en el día de la fecha (National Research Council, National Academy Press, Washington DC, 2010, y/o Directiva de la Unión Europea para Experimentos en Animales, 2010/63/EU).

La aprobación del protocolo será vigente desde la fecha antes indicada y por el lapso de cuatro años.

Número de Protocolo: 010-01-15
PROCOLO 010-01-15

"Estudio de la actividad probiotica de los microorganismos del kefir en la crianza de pollos parrilleros"

Responsable: Graciela Liliana De Antoni
Responsables Alternos: Marina Golowczyc
Válido hasta 22 de Febrero de 2021



La Plata, 10 de Julio de 2017

It is hereby certified that the Institutional Animal Care and Use Committee of the Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata dependence, has reviewed the protocol and procedure for the care and use of laboratory animals entitled "**Protocol of in vivo model (Balb/c mice) of the use of aflatoxin B1 (AFB1) and the interaction with probiotic microorganisms.**" and submitted by GRACIELA DE ANTONI (ANGELA LEON PELAEZ as alternative researcher). This Committee has found that the above procedures are in agreement with local guidelines for vertebrate animal welfare as well as with US Public Health Service and/or European Union policy on this matter (National Research Council, National Academy Press, Washington DC, 2010, and/or European Union Directive for Animal Experiments 2010/63/EU).


The above project is approved, effective on the above date.


Protocol Number 001-23-17

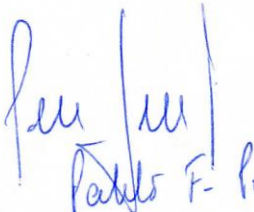
Se deja constancia que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata evaluó el protocolo de utilización de animales presentado por GRACIELA DE ANTONI (ANGELA LEON PELAEZ como responsable alterno), titulado "**Protocolo para el estudio in vivo Aflatoxinas (AFB1) y el desafío con microorganismos probióticos.**". Este comité considera que el mencionado protocolo se ajusta a las normas éticas de tratamiento humanitario locales e internacionales que deben aplicarse a los animales vertebrados que se utilizan en investigación biomédica y por tanto lo aprueba en el día de la fecha (National Research Council, National Academy Press, Washington DC, 2010, y/o Directiva de la Unión Europea para Experimentos en Animales, 2010/63/EU).

La aprobación del protocolo será vigente desde la fecha antes indicada y por el lapso de cuatro años.

Número de Protocolo: 001-23-17


Natalia Lousada


D. Hozar.


Pablo F. P.

PROTOCOLO 001-23-17

"Protocolo para el estudio in vivo Aflatoxinas (AFB1) y el desafío con microorganismos probióticos."

Responsable: GRACIELA DE ANTONI

Responsables Alternos: ANGELA LEON PELAEZ

Válido hasta 10 de Julio de 2021

Estudios complementarios

Estudio previos de la acción de la AFB₁ *in vivo*

Estos estudios complementarios se presentan como parte de un análisis preliminar del efecto de AFB₁ en modelos *in vivo*. Para iniciar este estudio se eligió el modelo de ratón Balb/c. Este modelo ha sido usado en otros estudios con AFB₁, encontrando efectos medibles y cuantificables en el proceso de intoxicación.

Para efectos de formación y conocimiento de tema se agrega este estudio preliminar como parte del trabajo tesis doctoral.

1. Uso de ratones BALB/c en la intoxicación por Aflatoxina B₁

Existen diferentes modelos animales para el estudio de las aflatoxinas, pero la susceptibilidad a estas toxinas varía mucho con el sexo, la edad, las especies animales y la cepa dentro de una especie (Richard et al., 2003). Los valores LD₅₀ (dosis letal para el 50% de los animales) verificados experimentalmente para ratas, por ejemplo, varían entre 0,75 y 17,9 mg / kg de peso corporal entre animales de diferente edad, sexo o cepa y sucede lo mismo para diferentes especies (Gratz 2007). Los autores referenciados en la tabla 1, realizaron estudios con ratones BALB/c mostrando algunos cambios y signos de intoxicación en el modelo. A continuación se describen las dosis usadas en los diferentes trabajos.

Tabla 1: Referencias de las dosis suministradas de AFB₁ en diferentes estudios en modelo de ratón BALB/c

Características	Dosis	Fuente
Sexo/edad	µg de AFB1 por kg de ratón	
Hembras/ 4 semanas	2500 por 2 semanas	(Sun et al. 2014)
Machos/ 6-7 semanas	1250 por 7 días	(Bakheet et al. 2016)
Machos/ 6 semanas	250 por 15 días	(Brahmi et al. 2011)
Hembras/ 6 semanas	750 por 15 días	(Jebali et al. 2014)

MATERIALES Y METODOS

Experimentos *in vivo*

1. Preparacion de Aflatoxina B₁

A partir de AFB₁ BioPure® se preparó una dilución stock en PBS de concentración 100ppm (solución madre). A partir de esta, se prepararon diferentes diluciones que fueron empleadas para los estudios animales.

2. Animales empleados

Para el ensayo *in vivo* se usaron ratones BALB/c (hembras) categoría SPF (Libre de patógenos específicos) de 5 a 6 semanas de edad, provistos por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. El protocolo experimental fue avalado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de animales de laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (Ver anexo 3). Los animales se alojaron en el bioterio de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Los ratones recibieron agua y alimento *ad libitum* y el ciclo de luz-oscuridad fue 12/12 y permanecieron una semana previa al inicio de los tratamiento desde su arribo para que se adaptaran a las condiciones del bioterio. Todos los procedimientos fueron realizados bajo las normas internacionales de trabajo con animales de experimentación (Sade 2011; Festing & Patel 2005).

3. Esquema general de los ensayos *in vivo*

Se emplearon grupos entre 3 y 5 animales por grupo, donde se suministraron las dosis de AFB₁ elegidas: 250 µg/kg (dosis baja), 500 µg/kg (dosis media) y 750 µg/kg (dosis alta). Se realizaron dos experimentos independientes.

4. Análisis de muestras

Los animales fueron pesados diariamente y al finalizar el tratamiento, los mismos fueron sacrificados en cámara de CO₂. Mediante necropsia se tomaron diferentes muestras, como se especifica en la Tabla 3.

Tabla 2: Toma de muestras y análisis

MUESTRAS	ANALISIS REALIZADO
Sangre 1.5 ml	<ul style="list-style-type: none"> Enzimas hepáticas Aminotransferasa (AST) y Aspartato alaninotransferasa (ALT)
Hígado	<ul style="list-style-type: none"> Peso Histología
Bazo	<ul style="list-style-type: none"> Peso
2 cm de duodeno	<ul style="list-style-type: none"> Mieloperoxidasa (MPO)

3.1 Variación de peso

Se analizó el cambio de peso de cada individuo de los diferentes grupos; los ratones se pesaron el día 0 y el día 15. Posteriormente se realizó un análisis de porcentaje de variación de peso según la ecuación 1:

$$\Delta p = (P_0 - P_1) / P_0 \text{ (Ecuación 1)}$$

Donde:

P_0 = es el peso del ratón al día 1

P_1 = Peso del ratón día 15

Previo a recibir el tratamiento diario, los ratones fueron pesados en una balanza granataria (Ohausus® Ohio, Estados Unidos) con una precisión de 0,01 g. Para evitar

variaciones respecto al horario del día, la dosificación de los tratamientos se realizó cada 24 horas.

3.2 Determinación de transaminasas en suero

El sacrificio de los ratones se realizó por inhalación de CO₂ una vez finalizados los 15 días de tratamiento. Se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca; las muestras de sangre se incubaron 1 h a 37 °C, se centrifugaron a 750 x g durante 15 min y los sueros se usaron para cuantificar las enzimas con un kit comercial Wiener Lab® para aspartato aminotransferasa (AST) y alanino aminotransferasa (ALT) en un analizador clínico Wiener Lab CM250 (Polonia).

3.3 Análisis del peso de los órganos blanco (hígado y bazo)

El hígado y el bazo fueron extraídos completamente y luego pesados en balanza analítica (Precisa Instrument Ltd., Switzerland) de precisión ± 0,1 mg. Se determinó individualmente el porcentaje de peso de cada órgano según el peso de cada ratón según la ecuación 2.

$$\%p = (P_o - P_i) / P_o \text{ Ecuación 2}$$

Donde

P_o = Peso del órgano

P_R = Peso el ratón al día 15

3.4 Análisis histopatológico

Después de haber sido pesados los hígados fueron lavados, se cortaron piezas de aproximadamente 5 mm² y se fijaron en formol al 10% v/v en PBS durante 24 horas. Se realizó la inclusión de las piezas en parafina siguiendo el procedimiento descrito en la tabla 3.

Tabla 3: Proceso fijación, inclusión y obtención de cortes histológicos de hígado.

Deshidratación		
Solvente	Numero de baños	Tiempo
Etanol 70°	3	10 min
Etanol 96°	3	10 min
Etanol 100°	4	10 min
Xileno	3	10 min
Inclusión		
Parafina	1	6 hora a 57°C
Parafina	1	6 hora a 57°C

Antes de que la parafina se endurezca los órganos son orientados, se dejan enfriar en heladera por lo menos 24 horas y posteriormente se realizan cortes histológicos de 5µm de espesor en un micrótopo (Leica® SM 2000 R).

Los cortes obtenidos luego del procedimiento anterior se tiñeron con Hematoxilina - Eosina (HE) como se describe en la tabla 4:

Tabla 4: Tinción de los cortes histológicos

Desparafinado		
Solvente	Pasajes	Tiempo
Xileno	3	5min
Etanol absoluto	2	2min
Etanol 96	2	2min
Etanol 80	1	2min
Agua destilada	1	1min
Coloración		
Hematoxilina	1	5min
Se lavó con agua corriente y luego con agua destilada		
Eosina	1	1min
Etanol 70	1	Rápidamente
Etano 96	2	2min
Etanol absoluto	2	2min
Xilol	2	2min

Una vez finalizada la coloración, las muestras se secaron durante 5 min. Se agregó una gota de bálsamo de Canadá (Anedra, Dinamarca) sobre la muestra coloreada y se

cubrió con un cubreobjetos, se esperó que estuviera seco para su observación en microscopio Leica® DM500 (Alemania).

3.4 Determinación de mieloperoxidasa (MPO) en duodeno

Se extrajeron 1-2 cm de duodeno de cada uno de los ratones, se lavaron con PBS, posteriormente las muestras fueron almacenadas a -80°C en Buffer acetato (50 mM de acetato de sodio pH 5,4) hasta su procesamiento. Una vez descongeladas las muestras se homogeneizaron en un Ultra Turrax® UTC, se centrifugaron a 12900 rpm durante 5 minutos. En el sobrenadante se determinó la concentración de proteínas por el método del Ácido bicinconínico (BCA) utilizando un kit de BCA siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit). Por otro lado, para la determinación de la MPO, 100 µl del sobrenadante se mezclaron con 50 µl de H₂O₂ 60 mM en buffer citrato 50 mM y 50 µl tetrametilbencidina (TMB) 0,01 M en HCl 0,1 N y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con el agregado de 50 µl de H₂SO₄ 2 N. Las muestras se centrifugaron y la absorbancia de los sobrenadantes se midió a 405 nm en un lector de placas (ELISA Plate Reader SLT Rainbow Reader, Wien, Austria). La actividad de MPO se referenció por mg de proteína total (MPO/mg) Los resultados de este ensayo se presentan como la variación relativa al control ($\Delta\text{MPO} = \text{MPO}_{\text{tratamiento}} / \text{MPO}_{\text{control}}$)

Resultados y discusión

1. Peso de los ratones

Una de las consecuencias de la intoxicación por AFB₁ es el descenso de peso debido a factores que incluyen la inhibición de la síntesis de proteínas (Jebali et al. 2014), por lo tanto se realizó un análisis del cambio de peso total entre el peso final e inicial de los ratones.

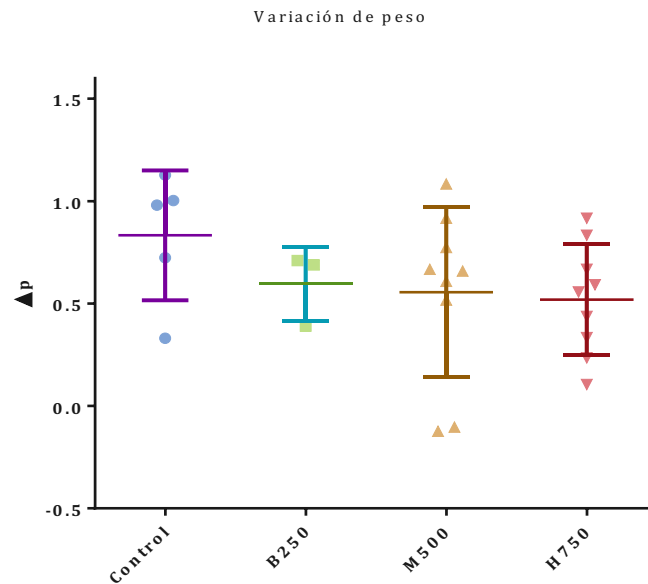


Figura 1: Porcentaje de ganancia de peso relativo al grupo control. $\Delta p = (P_0 - P_f) / P_0$; donde: P_0 es el peso de cada ratón al día 1 y P_f es el peso al día 15. B250 (dosis baja) M500 (dosis media) A750 (dosis alta). Los datos expresados en los gráficos corresponden a dos experimentos independientes.

En la figura 1 se puede observar la variación en el peso de los ratones tratados con AFB₁ y los ratones control, comparando el día 1 con el día 15 (día final del ensayo). No se observaron diferencias significativas en el cambio de peso entre los diferentes grupos tratados con AFB₁ y el grupo sin tratar. Tampoco se observaron diferencias entre los grupos tratados con las diferentes dosis de AFB₁

Los resultados obtenidos no coinciden con los resultados obtenidos en otras investigaciones las cuales reportaron que la administración de AFB₁ 250µg/ml, disminuyó la ganancia de peso neta en los ratones-y que atribuyeron los cambios de

peso a factores que incluyen la inhibición de la síntesis de proteínas y los defectos inducidos entre las células hematopoyéticas (Jebali et al. 2014). Varios estudios *in vivo* en roedores mostraron que AFB₁ induce lesiones intestinales en el duodeno y el íleon, caracterizadas por una infiltración leucocítica y linfocítica (Akinrinmade et al. 2016), lesiones que pueden estar relacionadas con la reducción en el metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos (Marai & Asker, 2008), dando como resultado un descenso de peso. Nuestros resultados no muestran indicios de este tipo de daño asociados al tratamiento con AFB₁.

2. Análisis del peso de hígado y bazo

El aumento en peso del hígado y del bazo es una consecuencia del daño generado por la intoxicación con AFB₁ (Clifford & Rees 1967; Troxel et al. 1997; Urrego Novoa, & Díaz 2015). En la figura 2 se puede ver la relación porcentual entre el peso de hígado o el bazo de los ratones tratados con relación a los ratones control. Los resultados de este ensayo se presentan como la variación relativa al control.

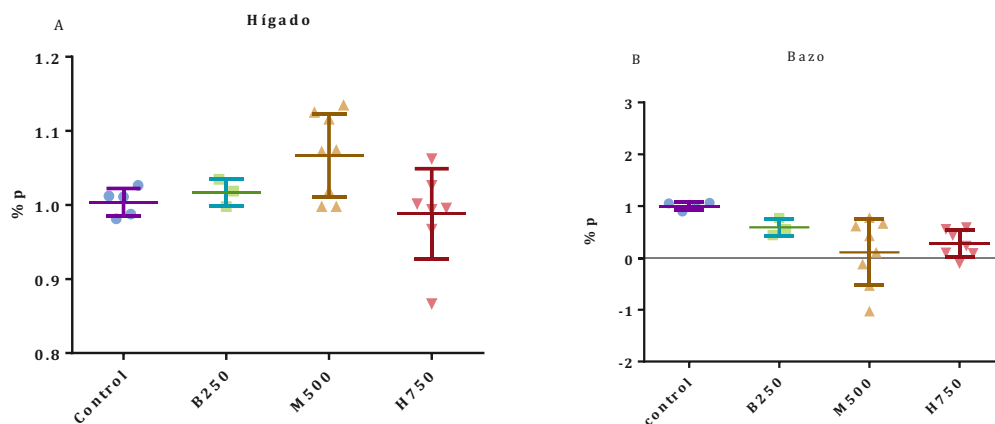


Figura 2: Peso de los órganos de los ratones tratados con relación a los ratones control. A) Hígado. B) Bazo. B250 (dosis baja) M500 (dosis media) A750 (dosis alta). Los datos expresados en los gráficos corresponden a dos experimentos independientes.

En la figura 2 se observa que la administración de AFB₁ en concentraciones de 500 µg/kg y 750 µg/kg de peso del ratón, generó una tendencia a la disminución del peso del hígado respecto al grupo sin tratar. Sin embargo, no se pudo determinar diferencias significativas en el peso de hígado y bazo respecto al grupo control. El hígado es el órgano blanco en los eventos de aflatoxicosis crónica, el cual se torna hiperplásico hasta extremadamente cirrótico, con fibrosis progresiva y desarrollo de tumores, tiene como características microscópicas aumento y necrosis en las células del parénquima hepático, degeneración grasa, fibrosis y proliferación de los conductos biliares, que pueden tener como consecuencia aumento anormal de tamaño y peso o también la disminución del mismo, lo cual depende de la manifestación hepática (Clifford & Rees 1967; Urrego Novoa, & Díaz 2015).

La hepatotoxicidad es debida a la biotransformación de AFB₁ en el hígado, en 2 fases mediadas por la acción de las oxidasas microsomales de función mixta. Por un lado ocurren reacciones de glucuronización, sulfación y acetilación o reacción con glutatión, dando lugar a metabolitos fácilmente excretables. Por otro lado las reacciones de oxidación, reducción e hidroxilación originan el 2,3 epoxiaflatoxina B1 (compuesto mutagénico que forma aductos con el DNA), el cual al unirse a las macromoléculas de las células hepáticas provoca procesos cancerígenos, daños histológicos que generan patologías tales como hígado graso y pálido, necrosis moderada a intensa y hemorragias (Fetaih et al. 2014; Martines Corcuera 2012; Nili-Ahmadabadi et al. 2011; Sun et al. 2014;).

Nuestros resultados no muestran evidencia de alteraciones ni en hígado ni en bazo, asociados con la ingesta de AFB₁. La actividad de las enzimas ALT y AST se han descrito como indicadores de lesión y función hepática (Lim et al. 2010; Sun et al. 2014; Yousofshahi et al. 2015), por lo cual se determinó la concentración de ambas. Los resultados obtenidos fueron (354,7±120,5UI/l) de ALT y (345±105,2 UI/l) de AST en el grupo control comparándolos con los tratamiento presentaron concentraciones similares que no permitieron determinar diferencias significativas.

3. Mieloperoxidasa en intestino delgado (MPO)

La medición de las diferentes moléculas en tejidos específicos se ha considerado como biomarcadores valiosos en los estudios de toxicidad de rutina para detectar daño o inflamación. La MPO es un indicador de inflamación intestinal, se considera un marcador bioquímico de la infiltración de neutrófilos (Krawisz et al., 1984). AFB₁ genera lesiones intestinales en el duodeno y el íleon, caracterizadas por una infiltración leucocítica y linfocítica (Akinrinmade et al. 2016). Por lo tanto se realizó una medida de la MPO en el duodeno.

En la tabla se observan los gráficos de la actividad de MPO en duodenos de ratones tratados con AFB₁ en diferentes dosis y en ratones control. Los resultados de este ensayo se presentan como la variación relativa al control.

Tabla 3: Mieloperoxidasa en intestino. MPO: Actividad MPO/g de proteína. B250 (dosis baja) M500 (dosis media) A750 (dosis alta). Los datos expresados en los gráficos corresponden a dos experimentos independientes.

Grupo	MPO (MPO/g Proteína)
control	1,00 ±0,07
B250	0,98 ±0,07
H750	1,09 ±0,15
M500	1,07 ±0,20

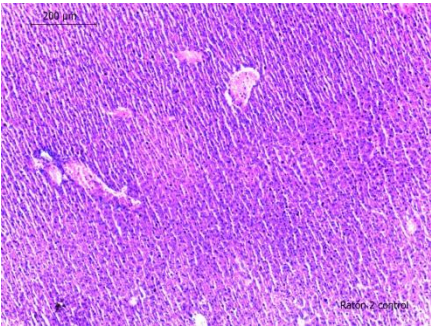
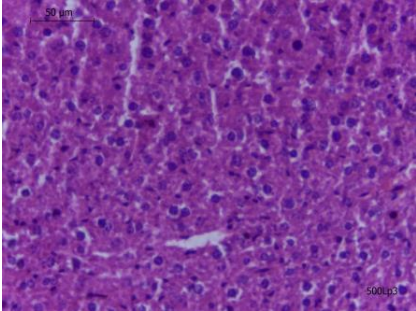
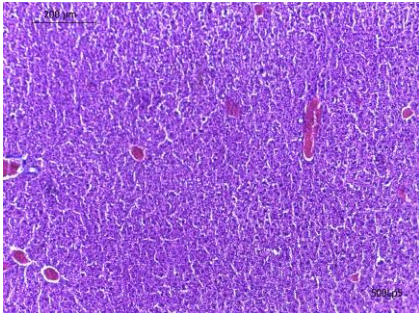
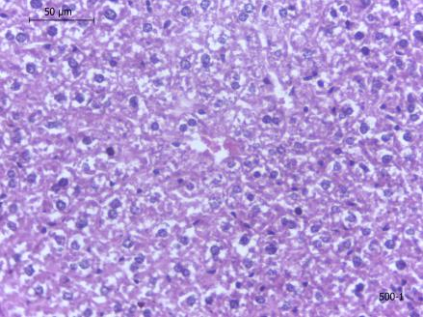
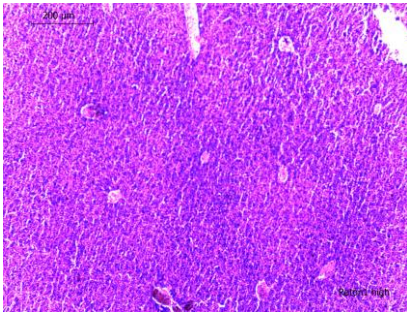
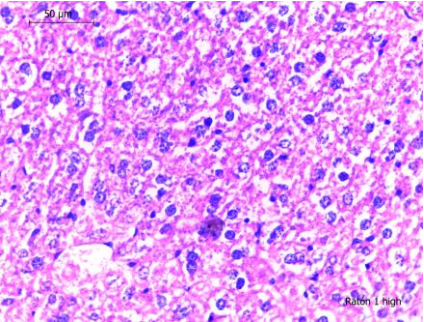
No se encontraron diferencias significativas entre los grupos. No se pudo observar un efecto inflamatorio sobre la mucosa gástrica asociada a la actividad MPO. Estudios realizados sobre la administración de AFB₁ indican que los animales expuestos disminuyeron la inmunidad mediada por células mientras que presentaron una respuesta inflamatoria (Meissonnier et al. 2008). La inflamación, la respuesta inmune y la reparación, son eventos importantes en la respuesta temprana a la lesión tisular ocasionada por AFB₁ (Zhu et al. 2017). En el presente estudio no se obtuvieron resultados que muestren por esta medida diferencias entre los grupos. Se ha demostrado que AFB₁ induce respuestas inmunoinflamatorias en el tracto

gastrointestinal de roedores y lesiones intestinales en el duodeno e íleon, caracterizadas por una infiltración leucocítica y linfocítica. La inflamación es una reacción de defensa del cuerpo contra una lesión, existen diversos marcadores de inflamación, entre estos se encuentra la MPO. Estos resultados no necesariamente indican que no hay inflamación, sino que MPO no es el marcador que más se manifiesta en el intestino. Existe algunas citoquinas proinflamatorias han sido relacionadas con la inflamación producida por AFB₁, entre esas se encuentran IL-1 β y TNF- α (Akinrinmade et al. 2016).

4. Histología de hígado

El órgano mayormente afectado por AFB₁ es el hígado, esta toxina está directamente relacionada con el desarrollo de cánceres hepáticos y aflatoxicosis aguda. La aflatoxicosis es una hepatitis aguda asociada con vómitos, dolor abdominal y edema. Entre las patologías desencadenadas por toxinas pueden aparecer lesiones histopatológicas y causar necrosis hepatocelular de leve a moderada. Por lo tanto, para completar el estudio de la administración de AFB₁ a ratones BALB/c se realizaron cortes histológicos de hígado de los grupos tratados para determinar si podía haber lesiones propias de la intoxicación. En la tabla 10 se muestran las fotografías tomadas a cortes histológicos con tinción Hematoxilina – Eosina (HE).

Tabla 6: Fotografía de los cortes histológicos de Hígado. Experimento 1 y 2

Grupo	10x	40x
Control		
Media		
Alta		

Cortes histológicos con tinción HE de hígados de los ratones tratados con AFB₁ Control: PBS; Media: 500 ppb/kg ratón; Alta: 750 ppb/kg ratón)

En la tabla 6 se muestran las fotografías de los cortes histológicos de los hígados de los ratones tratados con AFB₁ a concentraciones de 500 y 750 ppb/ kg ratón y de ratones sin tratar. En líneas generales, los hígados de los ratones tratados

con AFB₁ no mostraron alteraciones morfológicas ni anatómicas. Sin embargo, cuando los cortes se observaron con mayor aumento, los hepatocitos de los ratones tratados con AFB₁, presentaron un citoplasma claro luego de la tinción con hematoxilina-eosina. Esto podría estar relacionado con procesos de vacuolización o acumulación de sustancias lipídicas, propios del estrés oxidativo que ocurre en los procesos de intoxicación por AFB₁. En este sentido, Jha y col. 213, demostraron en ratones Swiss que la administración de AFB₁ en dosis de 750 y 1500 µg/kg de ratón, induce en hígado vacuolización e infiltraciones de lípidos, además de un proceso necrótico e infiltraciones celulares (Jha et al. 2013).

Por otra parte, los hepatocitos de los ratones tratados con aflatoxina presentaron núcleos de mayor tamaño tanto para la dosis alta como media, observándose además mayor cantidad de células binucleadas en comparación con el grupo de ratones control.

Estos resultados constituyen un aporte para la puesta a punto de un modelo animal para el estudio del efecto de aflatoxinas en un modelo murino.

Conclusión

Al evaluar los parámetros fisiológicos de los ratones Balb/c expuestos a diferentes dosis de AFB₁ no se encontraron diferencias significativas en ninguno de las medidas evaluadas.

Si bien los modelos *in vivo* representan una alternativa de estudio más rica y compleja en comparación con modelos *in vitro*, la amplitud de medidas que tiene un sistema tan complejo puede representar una dificultad para determinar parámetros específicos en respuesta al modelo propuesto. En el ensayo se evaluaron aspectos generales de los órganos blanco de la intoxicación con AFB₁, sin obtener resultados significativos. Estos resultados no necesariamente implican que el modelo no desarrolle la patología por la administración de AFB₁, sino que las medidas y condiciones realizadas no permitieron dilucidar los cambios ocasionados por la intoxicación. Es una perspectiva interesante abarcar el modelo con modificaciones de los tiempos de exposición a AFB₁, y concentración suministrada, tiempos de sacrificio, que son las variables externas al modelo. Desde el punto de vista interno los animales permiten realizar otras medidas más específicas en los tejidos, como pueden ser marcadores de inflamación (citoquinas proinflamatorias).

Para nuestro grupo de trabajo, el ajuste en el modelo representa un desafío ya que esto permitiría dilucidar un sistema que permita desafiar la intoxicación por AFB₁ con el consumo de microorganismos probióticos.

Referencias bibliográficas

- Akinrinmade, F. J., Akinrinde, A. S. & Amid, A. (2016) Changes in serum cytokine levels, hepatic and intestinal morphology in aflatoxin B₁-induced injury: modulatory roles of melatonin and flavonoid-rich fractions from *Chromolaena odorata*, *Mycotoxin Research*, 32(2), pp. 53–60
- Bakheet, S. A., Attia, S. M., Alwetaid, M. Y., Ansari, M. A., Zoheir, K. M. A., Nadeem, A., Al-Shabanah, O. A., Al-Harbi, M. M. & Ahmad, S. F. (2016) β -1,3-Glucan reverses aflatoxin B₁-mediated suppression of immune responses in mice, *Life Sciences*. 152, pp. 1–13.
- Brahmi, D., Bouaziz, C., Ayed, Y., Ben Mansour, H., Zourgui, L. & Bacha, H. (2011) Chemopreventive effect of cactus *Opuntia ficus indica* on oxidative stress and genotoxicity of aflatoxin B₁, *Nutrition & Metabolism*, 8(73), pp. 1–16
- Clifford, J. I., & Rees, K. R. (1967). The action of aflatoxin B₁ on the rat liver. *Biochemical Journal*, 102(1),p 65.
- Corcuera, L. A. (2012). Estudio de la toxicidad combinada de aflatoxina B₁ y ocratoxina A en modelos " *in vitro*" e " *in vivo*". Tesis Doctoral, Universidad de Navarra.
- Festing, S. and Patel, T. (2005) The ethics of research involving animals: a review of the Nuffield Council on Bioethics report from a research perspective., *Alternatives to laboratory animals : ATLA*, 33(6), pp. 654–8.
- Fetaih, H. A., Dessouki, A. A., Hassanin, A. A. I. & Tahan, A. S. (2014) Toxopathological and cytogenetic effects of aflatoxin B₁ (AFB₁) on pregnant rats, *Pathology Research and Practice*. 210(12), pp. 1079–1089.
- Gratz, S. (2007). Aflatoxin binding by probiotics: experimental studies on intestinal aflatoxin transport, metabolism and toxicity. Tesis doctoral. University of Kuopio.
- Jha, A., Krithika, R., Manjeet, D. & Verma, R. J. (2013) Protective Effect of Black Tea Infusion on Aflatoxin-Induced Hepatotoxicity in Mice, *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 3(1), pp. 29–36.
- Lim, A. Y. L., Segarra, I., Chakravarthi, S., Akram, S. & Judson, J. P. (2010) 'Histopathology and biochemistry analysis of the interaction between sunitinib and paracetamol in mice.', *BMC pharmacology*, 10(14), pp. 10-14..
- Marai, I. F. M., & Asker, A. A. (2008). Aflatoxins in rabbit production: hazards and control. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 8(1).pp 1-28
- Meissonnier, G. M., Pinton, P., Laffitte, J., Cossalter, A.-M., Gong, Y. Y., Wild, C. P., Bertin, G., Galtier, P. & Oswald, I. P. (2008) Immunotoxicity of aflatoxin B₁: Impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression, *Toxicology and Applied Pharmacology*. Academic Press, 231(2), pp. 142–149.

Nili-Ahmadabadi A, Tavakoli F, Hasanzadeh Gr, Hr, R. and Sabzevari O (2011) 'Protective effect of pretreatment with thymoquinone against Aflatoxin B₁ induced liver toxicity in mice', DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 19(4), pp. 282–287.

Richard, J. L., Payne, G. A., Desjardins, A. E., Maragos, C., Norred, W. P., & Pestka, J. J. (2003). Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. CAST Task Force Report, 139, pp 101-103.

Sade, R. M. (2011) From laboratory to bedside: ethical, legal and social issues in translational research., The American journal of the medical sciences., 342(4), pp. 265–6..

Jebali, R., Abbes, S., Salah-Abbes, J. B., Younes, R. B., Haous, Z., & Oueslati, R. (2015). Ability of *Lactobacillus plantarum* MON03 to mitigate aflatoxins (B₁ and M₁) immunotoxicities in mice. Journal of immunotoxicology, 12(3), pp 290-299.

Sun, L. H., Lei, M. Y., Zhang, N. Y., Zhao, L., Krumm, C. S. & Qi, D. S. (2014) Hepatotoxic effects of mycotoxin combinations in mice, Food and Chemical Toxicology, 74, pp. 289–293

Troxel, C. M., Reddy, P., O'Neal, P. E., Hendricks, J. D. & Bailey, G. S. (1997) 'In vivo aflatoxin B₁ metabolism and hepatic DNA adduction in zebrafish (*Danio rerio*).', Toxicology and applied pharmacology, 143(1), pp. 213–20..

Urrego Novoa, J. R & Díaz, G. J (2015) Aflatoxins and its mechanisms of toxicity in hepatic cancer, Revista Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, 54(2), pp. 108–116.

Yousofshahi, M., Manteiga, S., Wu, C., Lee, K. & Hassoun, S. (2015) Proximal: a method for Prediction of Xenobiotic Metabolism', BMC Systems Biology. BMC Systems Biology, 9(1), p. 9-94.

Zhu, P., Zuo, Z., Zheng, Z., Wang, F., Peng, X., Fang, J., Cui, H., Gao, C., Song, H., Zhou, Y. & Liu, X. (2017) Aflatoxin B₁ affects apoptosis and expression of death receptor and endoplasmic reticulum molecules in chicken spleen.', Oncotarget. Impact Journals, LLC, 8(59), pp. 99531–99540.