

2012

71217

71217

MFN:
Clasif:
T-779

71217



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
LABORATORIO DE MICOLOGÍA

TESIS DOCTORAL EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

2012

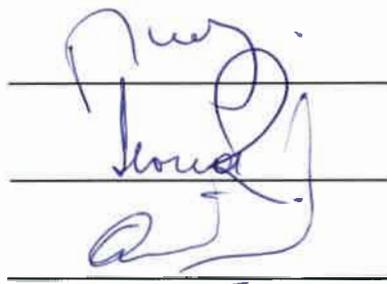
“Estudio de las propiedades benéficas de levaduras autóctonas con potencialidad probiótica y decontaminante de micotoxinas con aplicación en la producción animal.”

Este trabajo fue realizado en la Orientación de Micología del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales y se presenta como requerimiento para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas.

Tesista: Lic. M. Romina Armando

Director: Dra. Lilia R. Cavaglieri

Co-Director: Dra. Ana M. Dalcero

Three horizontal lines with handwritten signatures in blue ink. The top signature is for the author, Romina Armando. The middle signature is for the director, Lilia R. Cavaglieri. The bottom signature is for the co-director, Ana M. Dalcero.

Tribunal de Tesis:

Dra. Lucila Barberis

Dr. Miguel A. Galvagno

Dr. Jorge A. Reinheimer

Three horizontal lines with handwritten signatures in blue ink. The top signature is for Dra. Lucila Barberis. The middle signature is for Dr. Miguel A. Galvagno. The bottom signature is for Dr. Jorge A. Reinheimer.

Agradezco a mi familia y al amor de mi vida, por alentarme con amor a seguir el camino correcto durante todo el transcurso de mi vida y mi carrera. A las Doctoras Lilia Cavaglieri y Ana Dalcerro por brindarme su conocimiento, paciencia y compromiso. A mis amigos por estar incondicionalmente y contribuir al logro de mis metas.

RESUMEN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por hongos, principalmente de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*. La contaminación de productos agrícolas y alimentos balanceados con micotoxinas es un problema de importancia mundial que afecta tanto a la salud pública como a la economía, provocando en los animales rechazo del alimento, disminución de la tasa de crecimiento y reducción de la función inmunológica, lo que produce efectos negativos sobre la producción. Se han desarrollado diferentes estrategias de prevención y control de micotoxicosis utilizando microorganismos. Una estrategia que resulta promisorio es la utilización de levaduras autóctonas que además de disminuir la biodisponibilidad de las micotoxinas en el tracto gastrointestinal de los animales tienen propiedades probióticas sobre el huésped al ser aplicados en alimentos. El principal objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de cepas de levaduras autóctonas para adsorber micotoxinas, ejercer una acción probiótica e inhibir el crecimiento de hongos toxicogénicos en alimentos destinados a la producción animal. Para el logro de estos objetivos se realizaron los siguientes estudios: 1) se aislaron e identificaron levaduras a partir de alimento balanceado, intestino y materia fecal de animales de producción, 2) se determinó la capacidad de adsorción, *in vitro*, de aflatoxina B₁, zearalenona y ocratoxina A, por cuatro cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones gastrointestinales simuladas y a diferentes concentraciones de cada toxina, 3) se seleccionaron aquellas levaduras capaces de ejercer una acción preventiva, inhibiendo el crecimiento de los hongos toxicogénicos en diferentes condiciones ecofisiológicas *in vitro*, 4) se estudiaron las propiedades benéficas de las levaduras en estudio a través de las pruebas de tolerancia a las condiciones gastrointestinales, capacidad de adhesión a las células epiteliales intestinales del huésped, autoagregación, capacidad de reducir o excluir microorganismos patógenos, persistencia y multiplicación en el huésped y capacidad de coagregación, 5) se optimizó la producción de biomasa de una de las levaduras seleccionadas (*S. cerevisiae* RC016) en biofermentadores a través de un diseño estadístico. Los resultados obtenidos demostraron que las cepas de levaduras autóctonas fueron capaces de adsorber micotoxinas (AFB₁, ZEA, OTA) a diferentes concentraciones y bajo condiciones gastrointestinales simuladas. Dichas levaduras fueron capaces de tolerar el tránsito gastrointestinal simulado y presentaron una o más propiedades benéficas. Se demostró la capacidad de estas levaduras de controlar *in vitro* el crecimiento y desarrollo de hongos micotoxicogénicos y de inhibir la producción de micotoxinas en variadas condiciones ambientales, lo cual permite predecir que las levaduras presentes constituyen un agente potencial de detoxificación muy promisorio. En la etapa de la optimización de medio de cultivo para la producción de biomasa de la cepa *S. cerevisiae* RC016 se logró una mejora general en la producción de biomasa indicando la importancia del diseño adecuado de las condiciones de cultivo para lograr un aditivo alimentario benéfico a nivel de sanidad animal y rentable en términos económicos.

ABSTRACT

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by fungi, mainly from *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Alternaria* genera. The contamination of agricultural products and feeds with mycotoxins is a problem of global concern that affects both, public health and the economy, resulting in animal feed refusal, decreased growth rate and reduced immune function thus producing negative effects on production. Different strategies for prevention and control of mycotoxicosis using microorganisms have been developed. A promising strategy is the use of indigenous yeasts to decrease the bioavailability of mycotoxins in the gastrointestinal tract of animals with additional probiotic properties on the host when applied to food. The main objective of this study was to evaluate the ability of yeast strains to bind mycotoxins, to exert a probiotic action and to inhibit the growth of toxigenic fungi in feed for animal production. To achieve these objectives the following studies were conducted: 1) to isolate and identify yeast strains from feed, intestine and feces of pigs, 2) to determine the adsorption capacity of aflatoxin B₁, zearalenone and ochratoxin A by four strains of *Saccharomyces cerevisiae* under simulated gastrointestinal conditions and different concentrations of each toxin, *in vitro*, 3) to select those yeasts able to exert a preventive action, inhibiting the growth of toxigenic fungi at different ecophysiological conditions, *in vitro*, 4) to study the beneficial properties of these yeasts through gastrointestinal conditions tolerance tests, ability to adhere to host intestinal epithelial cells, autoaggregation capability, ability to reduce or exclude pathogens, persistence and multiplication in the host and coaggregation capability with pathogenic bacteria, 5) to optimize biomass production of one of the selected yeast (*S. cerevisiae* RC016) by biofermentors through a statistical design. The results showed that strains of yeasts were able to adsorb mycotoxins (AFB₁, ZEA, OTA) at different concentrations and under simulated gastrointestinal conditions. These yeasts were able to tolerate simulated gastrointestinal transit and they had one or more beneficial properties. It was demonstrated the ability of these yeasts to control, *in vitro*, growth and development of mycotoxigenic fungi (*Aspergillus parasiticus*, *A. carbonarius* and *Fusarium graminearum*) and inhibit the production of their mycotoxins (AFB₁, ZEA, OTA), under several environmental conditions, which predict that yeasts are potential and very promising agents for detoxification. An overall improvement of *S. cerevisiae* RC016 biomass production was achieved, indicating the importance of a proper design of the culture conditions to obtain a beneficial feed additive to perform animal health and also profitable in economic terms.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	
1. Micotoxinas: Generalidades	3
2. Principales especies fúngicas pertenecientes al género <i>Aspergillus</i> .	4-5
3. Principales especies fúngicas pertenecientes al género <i>Fusarium</i> .	5-6
4. Principales especies fúngicas pertenecientes al género <i>Penicillium</i> .	6-7
5. Principales micotoxinas y su impacto en la salud animal.	7
5.1. Aflatoxinas	8-9
5.2. Zearalenona	10
5.3. Ocratoxina	11
6. Revisión de la presencia de micotoxinas en los alimentos destinados al consumo animal en Argentina.	12
7. Regulación, prevención y tratamiento.	12-14
8. Probióticos	14
8.1. Generalidades	14
8.2. Beneficios que brinda el consumo de probióticos	15
9. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
9.1. Generalidades	15
9.2. Antecedentes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como probiótico y adsorbente de micotoxinas	16-19
Hipótesis y objetivos generales	20
SECCIÓN I	
Introducción a la sección	21-22
Hipótesis y objetivos específicos.	23
Materiales y métodos	
1. Medios de cultivo	24
2. Cepas	24
2.1. Cepas de levaduras	24
2.2. Cepas de bacterias patógenas	24
3. Aislamiento de levaduras a partir de muestras de diferentes orígenes	24
3.1. A partir de alimento	24
3.2. A partir de intestino animal	25
3.3. A partir de materia fecal	25
4. Conservación	25
5. Identificación de levaduras	25
5.1. Identificación morfológica	25-26
5.2. Identificación molecular de levaduras	26-27
6. Ensayos para la selección de potenciales probióticos	27
6.1. Tolerancia a bajo pH	27-28
6.2. Tolerancia a las sales biliares	28
6.3. Capacidad de atravesar el tracto gastrointestinal	28-29

6.4. Capacidad de autoagregación	29-30
6.5. Capacidad de coagregación con microorganismos patógenos	30
6.6. Producción de sustancias antimicrobiana	31
6.7. Ensayo de adhesión a líneas celulares	31-32
7. Análisis estadístico	32
Resultados y discusión	
1. Aislamiento e identificación de levaduras	33-36
2. Ensayos para la selección de potenciales probióticos	37
2.1. Capacidad de atravesar el tracto gastrointestinal	37-39
2.2. Capacidad de agregación	40-43
2.3. Producción de sustancias antimicrobiana	44-46
2.4. Ensayo de adhesión a líneas celulares	47-49
Conclusiones parciales	50
SECCIÓN II	
Introducción a la sección	51-52
Hipótesis y objetivos específicos.	53
Materiales y métodos	
1. Medios utilizados	54
2. Cepas de levaduras	54
3. Preparación del inóculo	54
4. Adsorción de micotoxinas	54
4.1. Microorganismos y condiciones de cultivo	54
4.2. Soluciones	54
4.3. Ensayos de adsorción	54-55
4.3.1. Cuantificación de aflatoxina B ₁ por HPLC	55
4.3.2. Cuantificación de zearalenona por HPLC	55
4.3.3. Cuantificación de ocratoxina A por HPLC	55-56
4.4. Efecto de la exposición de condiciones gastrointestinales sobre la adsorción de micotoxinas	56
4.4.1. Efecto de la exposición a pH ácido y sales biliares en la adsorción de ocratoxina A.	56
4.4.2. Efecto de la exposición a condiciones gastrointestinales simuladas en la adsorción de aflatoxina B ₁ y zearalenona.	56-57
5. Determinación del tamaño de la pared celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por Microscopía	57
5.1. Microscopía electrónica	57
5.2. Microscopía de alta resolución	57-58
Resultados y discusión	
1. Adsorción de micotoxinas	59-63
2. Efecto de la exposición de condiciones gastrointestinales sobre la adsorción de micotoxinas	63
2.1. Efecto de la exposición a pH ácido y sales biliares en la adsorción de ocratoxina A.	63-65
2.2. Efecto de la exposición a condiciones gastrointestinales simuladas en la adsorción de aflatoxina B ₁ y zearalenona.	65-67
3. Determinación del tamaño de la pared celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por estudios de microscopía electrónica.	68-70

Conclusiones parciales	71
SECCIÓN III	
Introducción a la sección	72-76
Hipótesis y objetivos específicos.	77
Materiales y métodos	
1. Identificación morfológica de hongos toxicogénicos	78
1.1. Medios y soluciones.	78
1.2. Identificación de las especies del género <i>Aspergillus</i>	78-79
1.2.1. Desarrollo experimental	79-80
1.3. Identificación de las especies del género <i>Fusarium</i>	80-81
1.3.1. Características a considerar para realizar la identificación	81-83
1.3.2. Desarrollo experimental	83
2. Efecto de la interacción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre el crecimiento y producción de micotoxinas de <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>A. carbonarius</i> y <i>Fusarium graminearum</i>	84
2.1. Microorganismos	84
2.2. Diseño del medio de cultivo	84
2.3. Preparación del inóculo	84
2.3.1. Inóculo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	84
2.3.2. Inóculo de hongos toxicogénicos	84
2.4. Estudios de tasa de crecimiento y fase de latencia	84-85
2.5. Producción de micotoxinas	86
2.6. Análisis estadísticos	86
Resultados y discusión	
1. Identificación de hongos micotoxicogénicos	87-89
2. Efecto de la interacción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en el crecimiento de hongos	90
2.1. Efecto de la interacción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la velocidad de crecimiento de <i>Aspergillus parasiticus</i>	90-91
2.2. Efecto de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la fase de latencia de <i>Aspergillus parasiticus</i>	92-94
2.3. Efecto de la interacción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la velocidad de crecimiento de <i>Aspergillus carbonarius</i> .	95-96
2.4. Efecto de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la fase de latencia de <i>Aspergillus carbonarius</i> .	97-98
2.5. Efecto de la interacción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la velocidad de crecimiento de <i>Fusarium graminearum</i>	99-100
2.6. Efecto de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la fase de latencia de <i>Fusarium graminearum</i>	101-102
3. Efecto de la interacción de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la producción de micotoxinas de <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Aspergillus carbonarius</i> y <i>Fusarium graminearum</i> .	103
3.1. Efecto de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre la producción de aflatoxina B ₁ de <i>Aspergillus parasiticus</i> .	103-105
3.2. Efecto de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre la producción de ocratoxina A de <i>Aspergillus carbonarius</i> .	106-108
3.3. Efecto de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre la producción de	109-113

zearalenona de <i>Fusarium graminearum</i> .	
Conclusiones parciales	114
SECCIÓN IV	
Introducción a la sección	115-118
Hipótesis y objetivos específicos.	119
Materiales y métodos	
1. Microorganismo	120
2. Preparación del inóculo	120
3. Curvas de crecimiento en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono (2%(g/v) de carbono): Yeast Nitrogen Base (YNB) suplementado con: melaza, glicerol, glucosa y etanol.	120-121
3.1. Crecimiento celular	121
3.1.1. Determinación de células viables	121
3.1.2. Concentración de levaduras totales	121
3.1.3. Determinación del peso seco	121
3.2. Parámetros cinéticos	121
4. Formulación de un medio de cultivo apropiado para la producción de biomasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 utilizando la metodología de los diseños experimentales estadísticos.	122
4.1. Preparación del inóculo	122
4.2. Diseños experimentales estadísticos y análisis de los resultados	122
4.2.1. Diseños de selección	122
4.2.2. Diseños de optimización	123
4.3. Medición de producción de biomasa	123
5. Validación del modelo: Fermentación en biorreactores (condiciones de <i>batch</i>) en condiciones optimizadas.	123
5.1. Preparación del inóculo	123
5.2. Procedimiento del cultivo	123-124
5.3. Medición de producción de biomasa	125
5.3.1. Determinación de células viables	125
5.3.2. Concentración de levaduras totales	125
6. Análisis de los resultados	126
Resultados y discusión	
1. Curvas de crecimiento en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono (2%(g/v) de carbono): YNB suplementado con: melaza, glicerol, glucosa y etanol	127-132
2. Formulación de un medio de cultivo apropiado para la producción de biomasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 utilizando la metodología de los diseños experimentales estadísticos	132-133
2.1. Diseños de selección de Plackett-Burman	133-138
2.2. Diseños de optimización (Diseño Central Compuesto)	138-145
3. Validación del modelo: Fermentación en biorreactores en condiciones optimizadas.	146-149
Conclusiones parciales	150
Conclusiones finales	151

Perspectivas futuras	152
Bibliografía	153-175
ANEXO	
1. Anexo de medios de cultivo y soluciones	176
1.1. Medios de cultivo	176-181
1.1. Soluciones	181-184

Índice de Figuras

Figuras	Página
Figura 1. Características microscópicas de los principales géneros fúngicos. (A) <i>Aspergillus</i> (B) <i>Fusarium</i> (C) <i>Penicillium</i> (D) <i>Alternaria</i>	4
Figura 2. Estructura química de las aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂ .	9
Figura 3. Estructura química de la zearalenona	10
Figura 4. Estructura química de la ocratoxina A	11
Figura 5: Esquema de metodología para evaluar capacidad de atravesar el tracto gastrointestinal.	29
Figura 6. Marcha de identificación en los diferentes medios de cultivo propuestos por Pitt y Hocking (1997). De izquierda a derecha: MEA, MY10-12, AMA, MY50G, MEA37°C y Cz.	36
Figura 7. Capacidad de coagregación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con bacterias patógenas.	43
Figura 8. Inhibición de crecimiento de cepas patógenas por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . (A) Cepa RC009. Resultado negativo. (B) Cepa RC012. Resultado positivo. (C) Cepa RC008. Resultado positivo.	46
Figura 9: Análisis de adherencia por microscopía óptica (40X) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC008 células Vero con colorante de Giemsa.	49
Figura 10: Análisis de adherencia por microscopía óptica (10X) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 a células Vero con colorante de Giemsa	49
Figura 11: Microscopia electrónica de pared celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (A) RC008, (B) RC009, (C) RC012, (D) RC016.	68
Figura 12: Características de los conidióforos de <i>Aspergillus</i> . A) uniseriado (izquierda), B) biseriado (derecha).	78
Figura 13: Esquema de inoculación para la identificación de especies del género <i>Aspergillus</i> , <i>Eurotium</i> y <i>Emericella</i> .	80
Figura 14: Características de los conidióforos de <i>Fusarium</i> .	81
Figura 15. Esquema de inoculación para la identificación de las	83

especies del género *Fusarium*.

Figura 16. Esquema de siembra para estudio de tasa de crecimiento y fase de latencia	86
Figura 17. Características macroscópicas de (A) <i>A. carbonarius</i> y (B) <i>A. parasiticus</i>	88
Figura 18. <i>Fusarium graminearum</i> en tubos con Agar Papa Glucosado	89
Figura 19. Efecto de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre el crecimiento de <i>Aspergillus parasiticus</i> . (A) : <i>Aspergillus parasiticus</i> (control). (B) : <i>Aspergillus parasiticus</i> en interacción con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC008 (interacción 2). Medio agar ensilaje pH 4, a_w 0,99, luego de 120 hs de incubación a 37°C.	94
Figura 20. Esquema de biorreactor (Ferreira, 2006)	125
Figura 21. Curva de crecimiento ($\text{Log}_{10} \text{DO}_{640 \text{ nm}}$) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 en medio con melaza en frascos agitados durante 66 h a 28°C.	128
Figura 22. Curva de crecimiento ($\text{Log}_{10} \text{DO}_{640 \text{ nm}}$) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 en medio con glucosa en frascos agitados durante 66 h a 28°C.	129
Figura 23. Curva de crecimiento ($\text{Log}_{10} \text{DO}_{640 \text{ nm}}$) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 en medio con etanol en frascos agitados durante 66 h a 28°C.	129
Figura 24. Curva de crecimiento ($\text{Log}_{10} \text{DO}_{640 \text{ nm}}$) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 en medio con glicerol en frascos agitados durante 66 h a 28°C	130
Figura 25. Curva de crecimiento ($\text{Log}_{10} \text{UFC mL}^{-1}$) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 en medio con melaza en frascos agitados durante 66 h a 28°C.	131
Figura 26. Curva de crecimiento ($\text{Log}_{10} \text{DO}_{640 \text{ nm}}$) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 en medio con melaza en frascos agitados durante 66 h a 28°C	131
Figura 27. Curva de crecimiento (Log_{10} peso seco) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 en medio con melaza en frascos agitados durante 66 h a 28 °C	132
Figura 28. Gráfico de superficie de DO en función de (A) porcentaje de melaza y concentración de DAP. (B) concentración de extracto de	138

levadura y porcentaje de melaza y **(C)** tiempo y porcentaje de melaza para el diseño de selección de Plackett-Burman. Los gráficos de contorno se muestran en la parte inferior de cada superficie de respuesta. La escala de colores muestra los niveles de producción de biomasa de la levadura.

- Figura 29.** Análisis de superficies de respuesta para el diseño de optimización que muestra el efecto sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* RC016 (DO 640nm) **(A)** de concentración de melaza (%) y extracto de levadura (YE) (g L⁻¹), **(B)** de concentración de melaza (Melaza)(%) y tiempo (h) y **(C)** extracto de levadura (g L⁻¹) y tiempo (h). Los gráficos de contorno se muestran en la parte inferior de cada superficie de respuesta. La escala de colores muestra los niveles de producción de biomasa de la levadura. 144
- Figura 30** Curva de crecimiento (Log₁₀ UFC mL⁻¹) de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 en medio con melaza en biorreactor durante 60 h a 28°C 146
- Figura 31.** Curva de crecimiento (Log₁₀ DO_{640nm}) de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 en medio con melaza en biorreactor durante 60 h a 28°C. 146
- Figura 32.** Velocidad específica de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en biorreactor. Medio Melaza 17% (p/v). Cepa RC016. 147

Índice de Tablas

Tablas	Página
Tabla 1. Macromoléculas de la pared celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (adaptado de Klis y col., 2006).	19
Tabla 2: Ensayo de autoagregación de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	30
Tabla 3. Ensayo de coagregación de levaduras con microorganismos patógenos.	30
Tabla 4. Ensayo de producción de sustancias antimicrobianas de las levaduras.	31
Tabla 5. Identificación morfológica y molecular de levaduras.	35
Tabla 6. Efecto de sales biliares y pH ácido en el crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	38
Tabla 7. Efecto del tránsito gastrointestinal simulado sobre la viabilidad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	39
Tabla 8. Capacidad de autoagregación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
Tabla 9. Ensayo de coagregación entre <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y cepas patógenas	42
Tabla 10. Actividad antimicrobiana de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> contra cepas patógenas	45
Tabla 11. Adhesión de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a células Vero.	48
Tabla 12. Niveles de captación de aflatoxina B ₁ (ng mL ⁻¹ y porcentaje %) por cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a diferentes concentraciones de toxina.	62
Tabla 13. Niveles de captación de zearalenona (µg mL ⁻¹ y porcentaje %) por cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a diferentes concentraciones de toxina.	62
Tabla 14. Niveles de captación de Ocratoxina A (µg mL ⁻¹ y porcentaje %) por cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a diferentes concentraciones de toxina.	63
Tabla 15. Porcentaje de adsorción de ocratoxina A (%) por cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tratadas con sales biliares (0,5%) and pH 2.	65
Tabla 16. Porcentaje de adsorción de aflatoxina B ₁ (%) por cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sometidas a condiciones gastrointestinales	67

artificiales.

Tabla 17. Porcentaje de adsorción de zearalenona (%) por cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sometidas a condiciones gastrointestinales artificiales.	67
Tabla 18. Relación entre el grosor de la pared celular/diámetro celular (μm) de las cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	69
Tabla 19. Significancia estadística de los factores cepas (C), pH, temperatura (T°) disponibilidad de oxígeno ($P^\circ\text{O}_2$), actividad de agua (a_w) y sus interacciones sobre velocidad de crecimiento de <i>Aspergillus parasiticus</i>	90
Tabla 20. Efecto de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre la velocidad de crecimiento de <i>Aspergillus parasiticus</i> bajo diferentes condiciones de pH, temperatura (T°), disponibilidad de oxígeno ($P^\circ\text{O}_2$) y actividad de agua (a_w).	91
Tabla 21. Significancia estadística de los factores cepas (C), pH, temperatura (T°) disponibilidad de oxígeno ($P^\circ\text{O}_2$), actividad de agua (a_w) y sus interacciones sobre la fase latencia de <i>Aspergillus parasiticus</i> .	92
Tabla 22. Efecto de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre la fase de latencia de <i>Aspergillus parasiticus</i> en interacción con diferentes condiciones de pH, temperatura (T°), disponibilidad de oxígeno ($P^\circ\text{O}_2$) y actividad de agua (a_w).	93
Tabla 23. Significancia estadística de cepas (C), pH, temperatura (T°) disponibilidad de oxígeno ($P^\circ\text{O}_2$), actividad de agua (a_w) y sus interacciones con velocidad de crecimiento de <i>Aspergillus carbonarius</i> .	95
Tabla 24. Efecto de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre la velocidad de crecimiento de <i>Aspergillus carbonarius</i> bajo diferentes condiciones de pH, temperatura (T°), disponibilidad de oxígeno ($P^\circ\text{O}_2$) y actividad de agua (a_w).	96
Tabla 25. Significancia estadística de los factores cepas (C), pH, temperatura (T°) disponibilidad de oxígeno ($P^\circ\text{O}_2$), actividad de agua (a_w) y sus interacciones sobre fase latencia de <i>Aspergillus carbonarius</i> .	97
Tabla 26. Efecto de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre la fase latencia de <i>Aspergillus carbonarius</i> en interacción con diferentes condiciones de pH, temperatura (T°), disponibilidad de oxígeno ($P^\circ\text{O}_2$) y actividad de agua (a_w).	98
Tabla 27. Significancia estadística de los factores cepas (C), pH,	99

temperatura (T°) disponibilidad de oxígeno ($P^\circ O_2$), actividad de agua (a_w) y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento de *Fusarium graminearum*.

Tabla 28. Efecto de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre la velocidad de crecimiento de <i>Fusarium graminearum</i> bajo diferentes condiciones de pH, temperatura (T°), disponibilidad de oxígeno ($P^\circ O_2$) y actividad de agua (a_w).	100
Tabla 29. Significancia de los factores cepas (C), pH, temperatura (T°) disponibilidad de oxígeno ($P^\circ O_2$), actividad de agua (a_w) y sus interacciones con fase de latencia de <i>Fusarium graminearum</i> .	101
Tabla 30. Efecto de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre la fase de latencia de <i>Fusarium graminearum</i> en interacción con diferentes condiciones de pH, temperatura (T°), disponibilidad de oxígeno ($P^\circ O_2$) y actividad de agua (a_w).	102
Tabla 31. Significancia estadística de los factores cepas (C), pH, temperatura (T°) disponibilidad de oxígeno ($P^\circ O_2$), actividad de agua (a_w) y sus interacciones sobre la producción de aflatoxina B ₁ (AFB ₁) de <i>Aspergillus parasiticus</i> .	104
Tabla 32. Efecto de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre la producción de aflatoxina B ₁ (AFB ₁) por <i>Aspergillus parasiticus</i> bajo diferentes condiciones de pH, temperatura (T°), disponibilidad de oxígeno ($P^\circ O_2$) y actividad de agua (a_w).	105
Tabla 33. Significancia estadística de los factores cepas (C), pH, temperatura (T°) disponibilidad de oxígeno ($P^\circ O_2$), actividad de agua (a_w) y sus interacciones sobre la producción de ocratoxina A (OTA) de <i>Aspergillus carbonarius</i> .	107
Tabla 34. Efecto de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre la producción de ocratoxina A (OTA) por <i>Aspergillus carbonarius</i> bajo diferentes condiciones de pH, temperatura (T°), disponibilidad de oxígeno ($P^\circ O_2$) y actividad de agua (a_w).	108
Tabla 35. Efecto de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre la producción de zearalenona (ZEA) por <i>Fusarium graminearum</i> bajo diferentes condiciones de pH, temperatura (T°), disponibilidad de oxígeno ($P^\circ O_2$) y actividad de agua (a_w).	110
Tabla 36. Composición de melaza de azúcar de caña (Téllez y col., 2004)	118
Tabla 37. Velocidad específica de crecimiento (μ_{max}) y tiempo de	130

duplicación (t_d) de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 en diferentes medios de cultivo.

Tabla 38. Diseño de selección de Plackett-Burman y respuesta observada para analizar el efecto de distintos factores (variables) nutricionales y fisicoquímicas sobre el crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016.	134
Tabla 39: ANOVA del modelo aplicado para producción de biomasa (DO_{640nm}) de <i>S. cerevisiae</i> RC016.	137
Tabla 40. Diseño central compuesto para la optimización y respuestas medidas.	140
Tabla 41. ANOVA del modelo aplicado para producción de biomasa (DO_{640nm}) de <i>S. cerevisiae</i> RC016.	141
Tabla 42. Resultados obtenidos en las variables independientes utilizando el análisis matemático de optimización.	145
Tabla 43. Velocidad específica de crecimiento (μ_{max}) y tiempo de duplicación (t_d) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> RC016 en frascos agitados y en fermentador.	147

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Micotoxinas: Generalidades

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos en los alimentos, principalmente por especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* y *Alternaria* (Figura 1). Su estructura química es extremadamente variable y de bajo peso molecular (entre 200 y 500). Son compuestos derivados de la condensación de las reacciones producidas bajo determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas que se producen cuando se interrumpe la reducción de los grupos cetona en la biosíntesis de los ácidos grasos, los cuales son metabolitos primarios utilizados por los hongos como fuente de energía. Las micotoxinas tienden a formarse al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria de crecimiento. La contaminación con micotoxinas afecta de manera global a gran parte del sector ganadero y cerealista, así como en el sector humano a nivel sanitario (Jelinek y col., 1989) especialmente prevalente en países tropicales y subtropicales (Bhat, 1988). Su impacto en la producción animal incluye tanto el costo de la eliminación de los alimentos contaminados como la reducción en los rendimientos productivos, el incremento de los costos en atención veterinaria, y el conjunto de esfuerzos económicos y técnicos dirigidos a reducir sus efectos negativos.

La organización para la alimentación y la agricultura (Food and Agriculture Organization - FAO) estima que más de un 25 % de la producción de alimentos en el mundo está contaminada en un cierto grado con micotoxinas (Lawlor y Lynch, 2001). Son numerosos los factores que pueden influir para la contaminación con hongos productores de micotoxinas, entre estos están la resistencia genética del cultivo, condiciones de transporte y almacenamiento inadecuado y un secado deficiente (Wood, 1992). Por tanto, la contaminación del producto puede ocurrir en cualquier punto de la cadena alimenticia, desde la cosecha, la recolección, el almacenaje hasta el transporte, la elaboración y la conservación. Las micotoxinas representan un grave problema en Argentina donde las condiciones climáticas y las prácticas de agricultura de almacenamiento se consideran propicias para el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas, además de no poseer suficiente sustento económico para controlar las condiciones de almacenamiento y para impedir la contaminación de hongos, en el sector de los cereales y derivados basados en cereales.

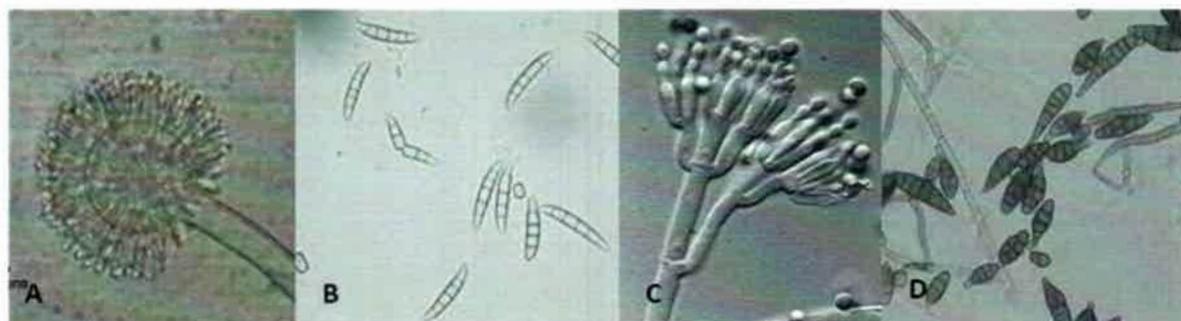


Figura 1. Características microscópicas de los principales géneros fúngicos. (A) *Aspergillus* (B) *Fusarium* (C) *Penicillium* (D) *Alternaria*.

2. Principales especies fúngicas pertenecientes al género *Aspergillus*.

El género *Aspergillus* es uno de los más frecuentes y conocido sobre la tierra. Representa una gran familia de hongos que ocupan diversos nichos ecológicos. Aunque están distribuidos mundialmente, son muy abundantes entre las latitudes 26° a 35°, norte o sur del ecuador (Klich y Pitt, 1988). La taxonomía actual reconoce 185 especies del género *Aspergillus*, tal vez 30 de éstas están bien definidas y se distinguen fácilmente (Kirk y col., 2001). Dentro de estas especies se encuentran los hongos más importantes económicamente, debido a dos razones: una positiva debido a que varias especies son utilizadas para la síntesis de productos químicos, la transformación biosintética y la producción de enzimas y otra negativa, debido a la gran importancia en el deterioro de los alimentos y la producción de micotoxinas (Pitt y Hocking, 2009).

Los hongos pertenecientes a éste género generalmente son considerados saprófitos y crecen en un número amplio de substratos, su capacidad para crecer a altas temperaturas y baja actividad acuosa, los hacen ventajosos para colonizar varios cultivos (Moss, 1991). Contaminan una amplia variedad de productos agrícolas (maní, maíz, mijo, sorgo, almendras, nueces, higos, pistachos y semillas de algodón, entre otros) en el campo o durante el almacenamiento, en las plantas procesadoras de alimentos y durante la distribución de los mismos.

Algunas de las especies de este género son importantes productores de micotoxinas, como las aflatoxinas (AFs), ocratoxinas (OTs), gliotoxina (Gli). Las especies de mayor importancia económica son *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Las especies *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, son productoras de AFs, mientras que *A. oryzae* y *A. tamarisii* no son toxicogénicos. Las cepas de *A. flavus*, son productoras de AFs del grupo B (AFB₁ y AFB₂), mientras que *A. parasiticus* y *A. nomius* son productoras del grupo B y G (AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂). No todas

las cepas son potencialmente toxicogénicas. Además, la especie *A. parasiticus* es más estable en la producción de estas toxinas que *A. flavus* (Frisvad y col., 2005). En los climas más calurosos, los cereales pueden contaminarse durante la pre-cosecha con *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. sydowii*, *A. terreus* y *A. versicolor*, especies normalmente asociadas con el almacenamiento de alimentos destinados al consumo de animales (Lacey, 1991). *Aspergillus fumigatus* es una especie de importancia, debido a su capacidad patogénica tanto para el hombre que manipula los alimentos contaminados, como para los animales que los ingieren, debido a que ocasiona micosis pulmonar (Pitt y Hocking, 1997; De Hoog y col., 2000). Además en los últimos años se ha demostrado que algunas cepas de esta especie son productoras de micotoxinas, entre ellas la Gliotoxina de importancia toxicológica en los animales debido a su efecto inmunosupresor (Dos Santos y col., 2003; Pereyra y col., 2008; Pena y col., 2009). Las especies como *A. ochraceus* y *Aspergillus* de la sección *Nigri* (grupo agregado *A. niger* y *A. carbonarius*) son reconocidas como potenciales productoras de ocratoxina A (OTA) (Abarca y col., 2001).

3. Principales especies fúngicas pertenecientes al género *Fusarium*.

Las especies pertenecientes a este género están distribuidas mundialmente y es común encontrarlas en regiones tropicales y templadas, aunque también es posible aislarlas en el desierto, en regiones alpinas y áreas árticas donde prevalecen condiciones adversas (Nelson, 1992). Esta amplia distribución puede atribuirse a dos factores claves, su capacidad para colonizar un amplio rango de sustratos y a un mecanismo eficiente para dispersarse en el tiempo y en el espacio. Estas características hacen que estas especies se adapten rápidamente a nuevos nichos ecológicos creados por el hombre. La mayoría son parásitos de plantas nativas y cultivadas, causando podredumbre de frutos, marchitamiento y tizones (Pitt y Hocking, 2009). Debido a esto y a su gran capacidad de adaptación a diferentes nichos, las especies del género *Fusarium* son consideradas como los patógenos de plantas más importantes del mundo. Estos hongos sobreviven en los residuos que quedan después de la cosecha, en forma de estructuras como los peritecios, siendo éste una fuente de inóculo para la cosecha del próximo año.

Leslie y Summerell (2006) incluyen 70 especies de *Fusarium*, sin embargo, la clasificación taxonómica de éste género se encuentra en un proceso de cambio con criterios biológicos y filogenéticos como así también conceptos morfológicos utilizados para delimitar a las especies. *Fusarium* es uno de los tres géneros productores de toxinas. Un número limitado de especies de *Fusarium* son responsables de la producción de la mayoría de las micotoxinas que pueden

contaminar cereales como trigo, avena, cebada, maíz, arroz y otros granos, utilizados para la alimentación humana y animal. Las micotoxinas de *Fusarium* más distribuidas son los tricotecenos, el más importante de éstos es el deoxinivalenol (DON) producido por *F. graminearum*, *F. culmorum* y especies relacionadas. Otro metabolito producido por éste género es la zearalenona (ZEA), que es un análogo de estrógeno, producido por algunas especies del género que también producen DON (Whitlow y Hagler, 2002). Otra toxina, T-2 producida principalmente por *F. sporotrichioides* causó la muerte de humanos y animales durante la década del 20, pero actualmente, no es común su incidencia (Pitt y Hocking, 2009). Otras especies como *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* son productores de fumonisinas (FBs) (Miller, 1994).

4. Principales especies fúngicas pertenecientes al género *Penicillium*.

Las especies del género *Penicillium* junto con las del género *Aspergillus* son de importancia económica, ya que, son considerados hongos de almacenamiento por crecer a baja actividad de agua. Este género es el más diverso en términos de número de especies y rango de hábitat. Las especies de éste género son ubicuas, oportunistas y saprófitas. Contaminan cereales como maíz, arroz y trigo, usados en la formulación de alimentos. La mayoría de las especies son hongos de suelo y su incidencia en los alimentos es accidental. Sin embargo, algunas de estas especies son patógenos fuertes de frutas (*P. digitatum*, *P. expansum* y *P. italicum*), pueden crecer a a_w debajo de 0.80 (*P. brevicompactum*, *P. chrysogenum* y *P. implicatum*) ó a baja tensión de O_2 (*P. roqueforti*). Varias especies son psicrótrofas y capaces de deteriorar los alimentos a bajas temperaturas (a_w). Por otro lado, algunos miembros de este género están asociados a la producción de alimentos de consumo humano como quesos y embutidos fermentados dándole al producto el aroma, el sabor y una apariencia característica (Abarca y col., 1994; Pitt y Hocking, 2009; Freire y col, 1999).

Numerosos metabolitos tóxicos son producidos por este género, y sólo algunos están asociados a los alimentos; los que poseen mayores efectos en la salud de humanos y animales son: OTA, ácido ciclopiazónico (ACP), citreoviridina, citrinina (CT), patulina (P) y ácido penicílico (AP), penitrem A, roquefortina y rubratoxinas, (Boutrif y Canet, 1998; Beretta y col., 2000). Estas micotoxinas consumidas regularmente, aún en cantidades mínimas, causan lesiones irreversibles en riñón, hígado, cerebro y tienen actividad teratogénica (Pitt y Hocking, 1999). Dentro de las toxinas producida por el género *Penicillium*, la OTA es una de las más importantes y es principalmente producida por *P. verrucosum*, encontrándose en

regiones de climas cálidos y templados (Frisvad y Samson, 1991; Varga y col., 1996). En muchos casos se ha detectado a OTA en co-ocurrencia con CT, producida por *P. citrinum*, donde ésta última ocurre en niveles superiores. Se han detectado cereales contaminados con OTA y CT como maíz, trigo, cebada, avena y centeno. En todas las especies estudiadas (ratas, ratones, cerdos, conejos, perros y pollos) ambas toxinas son nefrotóxicas (Scott, 1994; Scudamore y col., 1997). Existen datos de incidencia de otro metabolito tóxico, el ACP, que se encuentra en co-ocurrencia con las AFs en alimentos para animales a base de diversos cereales (Martins y Martins, 1999). Es un metabolito tóxico producido por varias especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. El principal productor del género *Penicillium* es *P. aurantiogriseum*. El ACP es muy tóxico e inmunosupresor a bajas dosis, y está implicado en micotoxicosis en cerdos y en aves (Gentles y col., 1999).

5. Principales micotoxinas y su impacto en la salud animal.

El impacto económico de las micotoxinas en la producción animal incluye un aumento en los costos de producción, segmentados en parámetros sanitarios, disminución de la producción, disposición final de alimentos y materias primas contaminadas e inversión en investigación y aplicación de métodos que reduzcan la severidad del problema.

Los principales factores que influyen en la toxicidad de las micotoxinas son:

- a) La especie animal (diferencia en sensibilidad)
- b) La concentración de la toxina y el tiempo de exposición
- c) Nutrición y estado sanitario de los animales
- d) La edad y sexo de los animales
- e) Presencia de varias toxinas (sinergismos).

Cada toxina tiene características y efectos específicos; sin embargo, cabe destacar que la concurrencia de dos o más micotoxinas, como normalmente se encuentran en la naturaleza, puede causar más efectos adversos, que la presencia de una sola. Por ejemplo, la aflatoxina en combinación con ocratoxina o tricotecenos, produce hepatitis, alta incidencia de salmonelosis, coccidiosis y bursitis en pollos (Jand y col., 1995).

Actualmente se conocen más de 200 diferentes micotoxinas presentes en granos como el maíz, trigo, cebada, arroz, maní, etc., considerándose a las AFs, la OTA y la ZEA, incluidas dentro de las principalmente asociadas a problemas de toxicidad alimentaria (Díaz, 2005)

5.1. Aflatoxinas

Las AFs han sido las micotoxinas más estudiadas hasta el presente; son producidas principalmente por *A. flavus* y *parasiticus*. Se sabe que las especies de *Aspergillus* se distribuyen ampliamente en todo el mundo. Sin embargo, las regiones de las altas temperaturas y humedad como las regiones tropicales, son las más favorables para el crecimiento de estos hongos (CAST, 2003).

Químicamente, las AFs son bifuranocumarinas y están divididas en 2 grupos, las del grupo B son bifuranocumarinas fusionadas a una ciclopentanona, y las del grupo G son bifuranocumarinas unidas a una lactona (Figura 2). Las AFs del grupo B se denominan así debido a que emiten fluorescencia azul (Blue) y las del grupo G porque emiten fluorescencia verde (Green) al ser irradiadas con luz ultravioleta de longitud de onda larga (365 nm). Los subíndices (1 y 2) se refieren a los patrones de movilidad (Rf) de los compuestos en cromatografía en capa delgada (TLC) La biotransformación de las AFs en varias especies animales resulta en la producción de aflatoxina M₁ (AFM₁) y aflatoxina M₂ (AFM₂). Estos metabolitos fueron los primeros aislados de leche de animales que consumieron alimentos contaminados con AFB₁. Las AFB₁, AFB₂, AFG₁, y AFG₂, son las que contaminan con mayor frecuencia alimentos de origen vegetal y sus productos derivados (Gourama y Bullerman, 1995).

Muchos productos agrícolas están sujetos a la contaminación por hongos aflatoxigénicos y, por ende, a la contaminación con AFs. Las AFs se pueden encontrar en cereales y sus subproductos, oleaginosas, mandioca, ensilados, forrajes, frutos secos, especias, leche y derivados y otros alimentos para humanos y animales. La AFB₁ es una dihidrofuranocumarina con propiedades carcinogénicas, teratogénicas y mutagénicas, hepatotóxicas e inmunosupresivas (Gimeno y Martins, 2003). Puede producir intoxicaciones agudas y crónicas. La intoxicación aguda se manifiesta por vómito, dolor abdominal, edema pulmonar, infiltración de grasa y necrosis del hígado. Sobre la intoxicación crónica por AFs interesan los efectos que se producen por la exposición por períodos largos de tiempo y a bajas concentraciones. En estos momentos, la AFB₁ es considerada por la Agencia Internacional para la Investigación del cáncer (IARC, 2003) como evidente cancerígeno en animales de experimentación y también ha sido clasificada como cancerígeno humano Grupo I.

El mecanismo de acción de la AFB₁, se fundamenta en la capacidad de los metabolitos activos de la misma (aflatoxin 8,9-epóxido) de interactuar con los hepatocitos, siendo capaz de ingresar al núcleo y unirse al ADN, lo que determina una inhibición de la ARN polimerasa y una disminución de la síntesis de ARN

mensajero, teniendo como consecuencia la disminución de síntesis proteica (Perozo y col., 2003). El consumo de AFs se relaciona en la implicancia de enfermedades en individuos jóvenes generando mal nutrición, dietas deficientes en proteínas pueden aumentar y complicar la toxicidad con AFs (Mphande y col., 2004). Según Marín y col. (2002), el efecto de las dietas contaminadas con AFs en bajas dosis 140 y 280 partes por billón (ppb), entregadas a 36 lechones por un periodo de cuatro semanas, produjo una disminución en el crecimiento, siendo más significativo en aquellos lechones que recibieron la dosis mayor (280 ppb).

Las señales clínicas de intoxicación aguda y subaguda con AFB₁ son depresión, y anorexia pudiendo desarrollar anemia, ascitis, ictericia, diarrea y hemorragia (Leman, 1992). Concentraciones pequeñas de AFB₁ muchas veces no provocan alteraciones como disminución de la ganancia de peso o baja en el consumo de alimento, pero son capaces de provocar alteraciones inmunológicas en el ámbito de la fagocitosis, disminuyen las concentraciones séricas de alfa-globulina, betaglobulina, gamma-globulina y fibrinógeno. Además, disminuye la capacidad de defensa natural ante agentes infecciosos, lo cual trae aparejado alteraciones provocadas por agentes secundarios como *E. coli* que produce disentería, colitis e ileitis (Gadd, 2005).

Por otro lado también influye en la expresión clínica de la intoxicación con AFs, la presencia de otras micotoxinas desconocidas hasta el momento que puedan estar presentes en las materias primas, pero también influyen múltiples aspectos de manejo, alimentación y enfermedades que pueden actuar de manera combinada y simultánea o sinérgica, facilitando la manifestación del estado clínico de micotoxicosis (Leman, 1992).

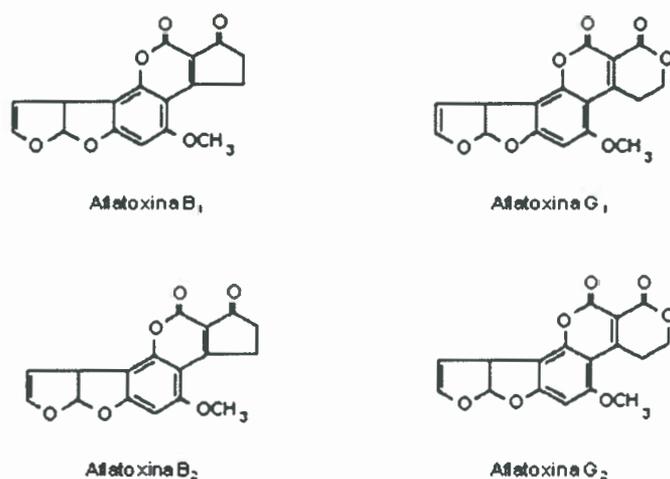


Figura 2. Estructura química de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂.

5.2. Zearalenona

Es una lactona derivada del ácido β -resorcílico. Su estructura química se muestra en la Figura 3. Posee buena estabilidad térmica y poca solubilidad en agua, por lo tanto, presenta alta solubilidad en solventes orgánicos. Es producida por hongos del género *Fusarium*, principalmente *F. graminearum*. Sin embargo, puede ser producida por otras especies como *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti* and *F. semitectum* (CAST, 2003). Se aíslan mayoritariamente en cereales simultáneamente con otras micotoxinas incluyendo tricotecenos, AFs, FBs y OTA (Tanaka y col., 1990; Luo y col., 1990; Yoshizawa, 1991; Park y col., 1996; Scudamore y Patel, 2000; Vargas y col., 2001; Binder y col., 2007). Las respuestas fisiológicas se producen en la especie porcina cuando el nivel de la ZEA en maíz es superior a unos 1 mg/kg (Kurtz y Mirocha 1978)

En el caso de la porcicultura, la presencia de granos contaminados con ZEA es un problema de repercusiones económicas muy severas por el impacto que tiene en la reproducción. Su mecanismo de acción es el de estimular la síntesis proteica particularmente a nivel del útero en los porcinos lo que provoca infertilidad, edema vulvar, prolapso vaginal, e hipertrofia mamaria en hembras; en machos se presenta atrofia testicular y agrandamiento de la glándula mamaria. Las hembras jóvenes en su estado de pre-pubescencia son las más sensibles a los efectos de ZEA con relación a los adultos. Sin embargo, la ZEA interfiere con la concepción, ovulación, implantación, desarrollo fetal y viabilidad del recién nacido. Concentraciones de 100 a 200 ppb en el alimento de las cerdas pueden afectar la fertilidad y aumentar el desarrollo embrionario (Leman y col., 1992). Sin embargo, no se han encontrado efectos teratogénicos con claridad y bien fundamentados (Yiannikouris y col., 2004). La ZEA tiene efectos negativos sobre la calidad y cantidad de semen producido por los verracos, es así como se demuestra en un estudio donde los machos que consumieron una dieta contaminada redujeron el volumen de espermatozoides y provocó una disminución en la motilidad espermática asociada a daño en la membrana, debido a alteraciones del metabolismo celular (Schwarzer, 2002),

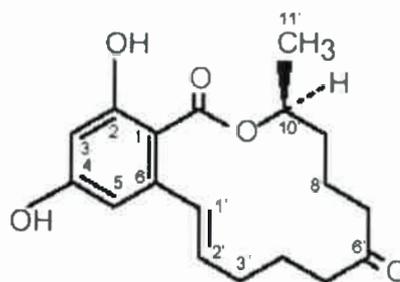


Figura 3. Estructura química de la zearalenona

5.3. Ocratoxina

Las OTs son isocumarinas clorinadas producidas principalmente por *A. ochraceus* y especies relacionadas como *P. verrucosum* y otras especies pertenecientes al género *Penicillium*. Estas especies son contaminantes de productos básicos agrícolas, especialmente de cereales (Kuiper-Goodman y Scott, 1989) y de una gran variedad de productos alimenticios (Bauer y Garies, 1987; Jorgensen, 1998). Dentro del grupo de las OTs existen 7 metabolitos, siendo la OTA la más estudiada y tóxica. La OTA es un producto cristalino e incoloro con característica de ácido débil, que emite fluorescencia al ser excitado con luz UV (Monaci y Palmisano, 2004), es una fenilalanina derivada de la sustitución de la isocumarina (Moss, 1996) (Figura 4).

La OTA se ha clasificado primariamente como una nefrotoxina en todas las especies de animales domésticos especialmente en cerdos (Krogh, 1976; Kotowski y col., 1993) y puede alterar la coagulación sanguínea, impedir la fagocitosis e inducir severa leucopenia, también aumenta la fragilidad intestinal y aumenta el depósito de glucógeno hepático. Se ha considerado a la OTA como posible causa de la enfermedad humana conocida como nefropatía endémica de los balcanes (BEN) (Pleština, 1992). Las dosis elevadas de OTA en las aves y los cerdos se asocian con daño renal, anorexia, debilidad, pérdida de peso e incremento de la mortalidad tras el consumo de esta toxina (Marquardt y Frohlich, 1992). La exposición crónica a esta toxina induce un descenso en el consumo de alimentos, incremento en el consumo de agua, deshidratación y daño renal. Se ha prestado especial atención a la OTA desde 1993, cuando la IARC clasificó esta toxina como un posible carcinógeno humano (grupo 2B) (Walker, 2002; Pittet, 1998).

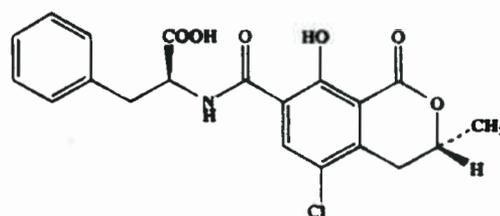


Figura 4. Estructura química de la ocratoxina A.

6. Revisión de la presencia de micotoxinas en los alimentos destinados al consumo animal en Argentina.

En todo el mundo se ha realizado el monitoreo de estas toxinas en productos destinados a la alimentación de los animales (Binder, 2007, Keller y col., 2007, Simas y col., 2007). Las principales regiones de producción animal en Argentina, que incluyen las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba se caracterizan por poseer temperaturas medias moderadas (2°C a 14°C en invierno, 14°C a 22°C en primavera, 22°C a 34°C en verano y 9°C a 20°C en otoño), con una amplia variabilidad térmica diaria, una precipitación media anual de 1034,4 mm y la humedad relativa entre el 50 y el 80%. Estas condiciones ambientales son óptimas para el desarrollo de hongos productores de micotoxinas.

En Argentina, la elaboración de alimentos es de gran importancia en la cría de animales, ya que representa entre un 75-80% de los costos totales de producción. Varios trabajos han informado sobre la microbiota y micotoxinas presentes en diferentes alimentos de la Argentina (Dalcero y col., 1997; Magnoli y col., 2002; González Pereyra y col., 2008). Entre los ingredientes que componen el alimento, el ensilado es una práctica cada vez más utilizada como fuente de alimentación animal y se considera una técnica favorable para el almacenamiento de forrajes durante un período de tiempo prolongado. La presencia de especies de hongos productores de importantes micotoxinas es uno de los principales problemas en el ensilaje. González Pereyra y col. (2009) demostraron la existencia de AFs, ZEA, DON y FB₁ en ensilaje de maíz y una alta contaminación de AFB₁ y ZEA en alimentos balanceado destinado a producción equina. Varios autores demostraron la ocurrencia simultánea de CT y OTA (Pereyra y col., 2009) y de AFB₁ en piensos destinados a la producción de aves de corral (Magnoli y col., 2008). También han observado una alta incidencia de micotoxinas como AFs (Alonso y col., 2010) y gliotoxinas (Pereyra y col., 2008) en ensilaje destinado a la producción bovina. Otros autores estudiaron las micotoxinas presente en alimentos a base de maíz destinados a cerdos de engorde, y observaron la presencia de AFB₁ y FB₁ (González Pereyra y col., 2008, Pereyra y col., 2011).

7. Regulación, prevención y tratamiento.

Teniendo en cuenta los riesgos que representan las micotoxinas sobre la salud pública, diferentes organismos a nivel mundial (OMS, FAO, FDA), han establecido límites en el contenido de micotoxinas en los alimentos para humanos y animales. El establecimiento de estas directrices ha facilitado el comercio y la adopción de medidas entre los diferentes países. Los primeros límites fueron fijados para las

AFs y para el año 2003 ya había 100 países con regulación de micotoxinas para alimentos e ingredientes para la alimentación animal.

Las recomendaciones para la prevención y reducción de las micotoxinas en los ingredientes destinados a la alimentación animal, las podemos agrupar en buenas prácticas de manejo de los cultivos y en el protocolo de establecimiento de puntos críticos y de control de riesgos (HACCP). Sin embargo, en la práctica es difícil controlar todos los factores y especialmente los ambientales. Con las siguientes estrategias se pretende reducir la carga de micotoxinas en las materias primas y alimentos:

1) Estrategias agronómicas

Reducir el estrés de las plantas, control de insectos, eliminación de residuos vegetales y rotación de terrenos, utilización de agentes antifúngicos y desarrollo de variedades de plantas resistentes a la contaminación fúngica.

2) Estrategias posteriores a la cosecha

Control medioambiental de conservación: contenido de agua, presión de O₂ y temperatura, control de plagas (insectos y roedores), separar granos partidos y cosechas dañadas antes de su almacenaje y utilizar inhibidores fúngicos, como el ácido propiónico. Sin embargo, una vez que las micotoxinas han alcanzado a contaminar un ingrediente o un alimento, resulta sumamente difícil lograr su total eliminación; por lo que se hace necesario recurrir a diferentes medios para neutralizarlas o por lo menos minimizar su concentración.

Los métodos utilizados para este propósito se pueden agrupar en físicos, químicos y biológicos. Algunos métodos físicos utilizados son la inactivación de las micotoxinas con elevadas temperaturas, los rayos UV y X o las irradiaciones con microondas. Otros métodos que pueden resultar efectivos son la limpieza de las semillas, su fraccionamiento mediante cribados y la extrusión. Entre los métodos químicos, se ha utilizado la amoniación y otros agentes oxidantes como peróxido de hidrógeno y ozono y algunos ácidos y álcalis.

También se han implementado adsorbentes físicos como los aluminosilicatos (zeolitas naturales, clinoptilolita, aluminosilicatos de sodio y calcio hidratados (HSCAS), bentonitas naturales, montmorillonita), el carbón activado, tierra de diatomeas y diferentes polímeros especiales con propiedades secuestrantes.

La eficacia de los adsorbentes físicos depende principalmente de la estructura química del adsorbente y la toxina (Huwig y col, 2001). Así, muchos de estos adsorbentes tienen capacidad de adsorción para un pequeño grupo de micotoxinas pero no para todas. Debemos destacar también el riesgo de que algunos

adsorbentes puedan fijar algunos micronutrientes, y reducir la biodisponibilidad de algunos minerales y vitaminas.

La descontaminación biológica mediante la utilización de microorganismos es otra de las estrategias utilizadas. Algunas bacterias integrantes de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) que se utilizan ampliamente en la fermentación de los alimentos poseen estructuras en la pared celular con capacidad para adherir micotoxinas (Shetty y Jespersen, 2006, Stanley y col., 1993, Celik y col., 2003).

El uso efectivo de alimentos funcionales que contengan cepas de levaduras como adsorbente de micotoxinas con propiedades probióticas constituye una alternativa promisoría.

8. Probióticos

8.1. Generalidades

En los últimos años se ha observado un creciente interés, tanto por parte de la comunidad científica como por parte de la población en general, al papel de los microorganismos empleados como **probióticos**, en el mantenimiento de la salud, la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades. El término probiótico etimológicamente deriva del griego pro: "a favor de" y biótico: "vida", en consecuencia, estrictamente significa "para la vida o en favor de la vida" y se aplica a los microorganismos que colaboran positivamente a favorecer la microbiota intestinal y a la mejora de la calidad de vida de los organismos superiores. La FAO (2001) aconseja definir probióticos como "microorganismos viables que, administrados en cantidad adecuada, confieren un beneficio de salud sobre el huésped. Para asegurar la efectividad de cultivos probióticos en el desarrollo de alimentos funcionales se deben tener en cuenta los siguientes criterios de selección:

- ✓ Origen. Especificidad de especie.
- ✓ Inocuidad. No debe ser patógena.
- ✓ Efecto Funcional. Debe demostrar el efecto benéfico de salud en pruebas clínicas.
- ✓ Viabilidad. Debe sobrevivir a lo largo del tracto digestivo. Resistente a pH ácido, a sales biliares y a enzimas gastrointestinales.
- ✓ Efecto de adhesión (adherirse al epitelio intestinal).
- ✓ Propagación Comercial. Debe crecer en condiciones comerciales y retener su viabilidad en el anaquel.



8.2. Beneficios que brinda el consumo de probióticos

Entre los beneficios comprobados para la salud que brindan los probióticos se pueden citar:

- ✓ Normalización de la composición de la microbiota intestinal.
- ✓ Síntesis de vitaminas del complejo B y de la vitamina K.
- ✓ Control y eliminación de bacterias patógenas y sus toxinas.
- ✓ Normalización de composición de la microbiota intestinal.
- ✓ Inmunidad a nivel del tubo digestivo para la prevención de infecciones intestinales.
- ✓ Control del síndrome del colon irritable y de enfermedades inflamatorias intestinales, así como también reducción del riesgo de contraer cáncer de colon.
- ✓ Disminución del colesterol sérico.
- ✓ Efectos inmunoestimuladores tales como: proliferación de células inmunes, aumento de la actividad fagocítica e incremento de la síntesis de IgA.
- ✓ Disminución de la sintomatología de las alergias alimentarias en niños y disminución de intolerancia a la lactosa.

Los microorganismos de mayor aplicación como probióticos son las bacterias productoras del ácido láctico, las cuales pertenecen a los géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, aunque también se incluyen especies del género *Bacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* y levaduras, de las que se distinguen principalmente especies del género *Saccharomyces* (Gasser, 1994; Donohue y col., 1996).

9. *Saccharomyces cerevisiae*

9.1. Generalidades

Las levaduras son hongos unicelulares de los cuales existen unas 600 especies agrupadas en 60 géneros. Estos microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, pero el género *Saccharomyces* es el que ofrece mayor interés industrial y aunque consta de 41 especies, *S. cerevisiae* es la levadura que más se emplea en numerosos procesos fermentativos (Schreuder y col., 1996). Los cultivos de esta especie son capaces de sobrevivir bajo las condiciones más adversas, comportándose de hecho, como anaerobios facultativos, de manera que aunque no aparecen como inquilinos habituales del tracto digestivo, mantienen su viabilidad en el tiempo, después de introducirse en este ecosistema.

Resultan fáciles de cultivar, tanto en el laboratorio como a escala industrial, con un medio de cultivo que contenga azúcares, sales minerales y una pequeña cantidad de extracto de levaduras o peptona. Las células de levaduras incorporan a su estructura nutrientes del medio y desarrollan una masa fúngica cuya composición química aproximada es de 40% de proteínas, 15% de ácidos nucleicos, 25% de polisacáridos, 15% de lípidos y 5% de compuestos hidrosolubles como nucleótidos, aminoácidos, azúcares, factores de crecimiento y enzimas entre otras (Pérez, 2000).

9.2. Antecedentes de *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico y adsorbente de micotoxina

Gracias a sus significativas propiedades nutricionales y farmacéuticas, *S. cerevisiae* ha sido aprobado como un microorganismo seguro para su empleo (EEC 70/524) en alimentación animal dentro de la Unión Europea (UE). Situación que concuerda con otros países como Japón, donde desde hace varios años *S. cerevisiae* forma parte de la farmacopea japonesa (Nitta y Kobayashi, 1999) o Estados Unidos donde la FDA (US-Food y Drug Administration) le ha otorgado el grado de microorganismo seguro o grado GRAS (Generally Recognised As Safe) (Kim y col. 2001).

Estudios realizados con levaduras de *S. cerevisiae* y *Candida albicans* sugieren que dependiendo de las condiciones de crecimiento, la pared celular de la levadura puede presentar de 10 a 25% del total del peso seco de la célula (Klis, 1994). Se ha estimado que el porcentaje de polisacáridos que puede contener la pared celular de la levadura puede ser alrededor de 85 a 90%, y de un 10 a 15% de proteínas. A escala estructural, la pared celular de la levadura está constituida por 3 grupos de polisacáridos: polímeros de manosa (manoproteínas, aproximadamente el 40% del peso seco de la pared celular), polímeros de glucosa (b-glucano, aproximadamente el 60% del peso seco de la pared celular) y polímeros de N-acetilglucosamina (quitina, 2% del peso seco de la pared celular). Estos polisacáridos se encuentran con diferentes grados de polimerización, tamaño o peso molecular y porcentajes dentro de la pared. La capa interna de la pared celular la componen moléculas de 1,3- β -glucanos moderadamente ramificados unidos por puentes de hidrógeno, que le proporcionan elasticidad a la red tridimensional que sirve de soporte a la capa externa constituida principalmente por mano-proteínas, o capa protectora que se extienden hacia el medio externo de la célula (Klis y col., 2006). De forma general, la conjunción de las 4 macromoléculas dentro de la pared celular de la levadura (Tabla 1) ocurre de la

siguiente manera: la porción proteica de la mano-proteína (100kDa aprox.) se une a la macromolécula de 1, 6- β -Glucano por medio de anclajes de tipo glicosilfosfatidilinositol que contienen 5 residuos de ligadura α -manosil; la macromolécula de 1, 6- β -Glucano a su vez presenta ramificaciones con enlaces $\beta(1, 3)$, a escala de estas ramificaciones la quitina puede unirse a ella por medio de enlaces $\beta(1, 4)$ y $\beta(1, 2)$; y finalmente, la porción terminal reducida de 1, 6- β -Glucano se conecta con la porción terminal no-reducida de la glucosa terminal del 1, 3- β -Glucano (Kollar y col., 1997).

Estos oligosacáridos (β 1-3 glucano y manano-proteínas), derivados de la pared celular de las levaduras realizan un papel muy activo en el incremento de la inmunidad no específica de los animales, además son capaces de inhibir la colonización por patógenos en el tracto digestivo y de adsorber micotoxinas (Savage y col., 1996; Stanley y col., 1996; Acevedo y Pedroso, 1999). Se demostró que en la avicultura intensiva, el uso de los β -1-glucano como aditivo en el alimento puede reducir las infecciones de campo y consecuentemente promover el crecimiento, reduciendo de esta forma la necesidad del uso de los antibióticos (Langeris y col., 1997).

Los beneficios obtenidos en la salud y productividad de los animales por la aplicación de levaduras en la dieta han sido extensamente documentados: reducción de la colonización de *Salmonella* en pollos de engorde (Line y col., 1997); incremento de la supervivencia ante la infección por Vibriosis en peces (Scholz y col., 1999); estimulación de la secreción intestinal de IgAs en ratas y ratones (Rodríguez y col., 2000); aumento de la capacidad oxidativa de neutrófilos sanguíneos en equinos (Paz y col., 2003); incremento en la digestibilidad de materia orgánica en corderos (Haddad y Goussous, 2005). En cerdos, los efectos benéficos que se observaron tras la administración de *S. cerevisiae* en la dieta fueron el incremento en la producción de inmunoglobulinas IgG y la reducción de coliformes en el TGI (White y col., 2002); incremento de la digestibilidad de materia orgánica y grasa (Van Heugten y col., 2003), aumento de peso, disminución de morbilidad y de mortalidad relacionada a problemas gastroentéricos (Lázaro y col., 2005); aumento en la productividad debido a una mejor recuperación de la mucosa digestiva (Bontempo y col., 2006).

La decontaminación de micotoxinas por *S. cerevisiae* ha sido estudiada recientemente (Shetty y Jespersen, 2006). En ensayos *in vitro* se ha demostrado la capacidad de *S. cerevisiae* de adsorber AFs, OTA y ZEA (Raju y Devegowda, 2002; Shetty y col., 2007; Bejaoui y col., 2004; Yiannikouris y col., 2004).

En alimentación de aves, los resultados positivos encontrados en modelos *in vitro* para la pared celular de levaduras como secuestrante de micotoxinas coinciden con los estudios *in vivo* en pollos de engorde, en los cuales las levaduras *S. cerevisiae* fueron capaces de contrarrestar los efectos tóxicos de piensos contaminados con AFB₁ suministrados a las aves (Stanley y col., 1993).

En estudios *in vivo*, los glucomananos, de la pared celular de *S. cerevisiae*, adicionados al alimento de pollos de engorde mostraron ser capaces de contrarrestar los efectos negativos de alimentos contaminados con AFs (Raju y Devegowda, 2000; Aravind y col., 2003; Murthy y Devegowda, 2004; Karaman y col., 2005), DON y ZEA (Chowdhury y Smith, 2004) sobre parámetros productivos.

Esta estructura altamente dinámica está fuertemente relacionada con la naturaleza de cada cepa debido a que existen más de 1200 genes involucrados en su síntesis. En estudios anteriores se ha demostrado que las condiciones de cultivo tales como el pH, la temperatura, la oxigenación, la naturaleza del medio, la concentración o la naturaleza de la fuente de carbono, modulan la cantidad y las propiedades estructurales de los β -D-glucanos, mananos y quitina que se sintetizan (Aguilar y col. 2003). Estos oligosacáridos (β 1-3 glucano y manano-proteínas) parecen ser el sitio de unión a las AFs, FBs, ZEA y OTA, es por esto que las condiciones de tracto gastrointestinal (GI) podrían producir modificaciones estructurales en la pared celular de la levadura influenciando sobre la adsorción de micotoxinas y disminuyendo su biodisponibilidad en el tracto GI del animal. Varios autores han demostrados que la capacidad de adsorción de cepas de levaduras varía en diferentes condiciones de pH y temperatura (Yiannikouris y col, 2004). Las diferencias en la adsorción que se observan entre las diferentes cepas de *S. cerevisiae* cuando son expuestas a diferentes condiciones del medio de cultivo, podrían ser explicadas por la variabilidad estructural de la pared celular de las levaduras.

Tabla 1. Macromoléculas de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (adaptado de Klis y col., 2006).

¹ Macromolécula	% de la pared celular	Promedio del GP/kDa
² Manoproteína	30-50	Altamente variable
1,6- β -Glucano	5-10	24/150
1,3- β -Glucano	30-45	240/1500
Quitina	1,5-6	25/120

¹ Los componentes son presentados en el orden en que se encuentran en la pared celular del exterior al interior de la célula. Condiciones de estrés en la pared celular provocan incrementos drásticos en los niveles de quitina.

GP = Grado de polimeración, kDa = kilodaltones o tamaño de la molécula.

² El contenido de proteína es de 4 al 5% de la masa restante y corresponde a la proteína ligada a las cadenas de carbohidratos de tipo manosa.

Hipótesis y Objetivos Generales

HIPÓTESIS GENERAL

“Las levaduras autóctonas son capaces de decontaminar micotoxinas e inhibir el crecimiento de hongos toxicogénicos y tienen potencialidad probiótica al ser aplicadas en alimentos destinados a la producción animal”

OBJETIVOS GENERALES

- ✓ Demostrar la capacidad de cepas de levaduras vivas para adsorber micotoxinas.
- ✓ Determinar la capacidad de las cepas de levaduras para ejercer una acción probiótica además de decontaminante.
- ✓ Determinar la capacidad de las cepas de levaduras para ejercer una acción inhibitoria hacia hongos toxicogénicos.

Sección I

Estudio de las propiedades benéficas de levaduras aisladas e identificadas a partir del medioambiente animal.

INTRODUCCIÓN A LA SECCIÓN

La industria de alimentos destinados a la producción animal se enfrenta cada vez más a presiones legislativas para reducir el uso de productos como promotores del crecimiento, relacionados químicamente con los antibióticos. La Comunidad Europea (CE), ha tomado acciones que prohíben la inclusión de los antibióticos como promotores de crecimiento (APC), en los alimentos para pollo de engorde y otras especies de origen animal, obligando a los nutricionistas a buscar nuevas fuentes de aditivos que por una parte sean inocuos para el animal y para el humano, y por otro lado, que tengan efectos benéficos (Garibay Torres, 2007).

Los probióticos con suplementos alimentarios a base de microorganismos que benefician al huésped mejorando el equilibrio microbiano intestinal cuando son administrados en concentraciones óptimas, contribuyendo a la supresión del crecimiento de patógenos y favoreciendo los procesos metabólicos del mismo. A través del tiempo se ha comprobado que desempeñan un papel fundamental en el control de enfermedades sin producir efectos negativos (Rolfe, 2000).

Saccharomyces cerevisiae ha sido estudiada como integrante en la dieta en pollos de engorde, demostrando que su uso frecuente reduce la carga de enteropatógenos como *Salmonella spp.* y *E. coli* y en menor proporción de *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus* y de virus, parásitos y hongos, lo que disminuye la incidencia de enfermedades y mejora el rendimiento productivo de los animales (Ferket, 2004). Esto lo consigue, al corregir el balance de la población microbiana, mejorar la asimilación de nutrientes generando una ganancia de peso importante en estos animales de engorde y al tener una acción estimulante de la inmunidad del animal, por lo que su uso como agente probiótico es útil y prometedor.

Se ha comprobado que *S. cerevisiae* mejora la digestibilidad de nutrientes cuando es aplicado como suplemento en la dieta de animales (Agarwal y col, 2000). Newbold y col. (1996), observaron que diferentes cepas de esta levadura tenían efectos benéficos en bovinos actuando en las células del epitelio intestinal, al resistir factores como presencia de lisozimas, enzimas pancreáticas, bajo pH, ácidos orgánicos y sales biliares presentes en estos animales, manteniéndose metabólicamente activas. Mathew y col, (1998), observaron que la adición de levaduras en la dieta basal de cerdos, genera un aumento de peso en estos animales.

Un microorganismo probiótico debe ser capaz de ejercer un efecto benéfico sobre el huésped y no ser patógeno ni tóxico, debe ser capaz de sobrevivir en el TGI y además debe permanecer viable y estable por largos periodos de almacenamiento.

Los probióticos deben excluir microorganismos patógenos, al competir por nutrientes, lugares de adhesión o al producir sustancias antimicrobianas.

La selección de cepas de *S. cerevisiae* como posibles agentes probióticos, se realiza en base a criterios fisiológicos, como son la tolerancia a bajos pH, a las sales biliares y enzimas digestivas, que les permitirá sobrevivir en el tracto gastrointestinal y la adhesión a la mucosa intestinal, un prerequisite que permitirá prolongar la permanencia del probiótico en el tracto intestinal del animal (Ouwehand y col., 1999).

HIPÓTESIS

✓ Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas poseen propiedades probióticas *in vitro*, y pueden utilizarse como aditivos alimentarios en la producción animal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Aislar e identificar levaduras a partir de alimento balanceado, intestino y materia fecal de animales de producción.

✓ Estudiar las propiedades probióticas de las levaduras aisladas a través de las pruebas de tolerancia a las condiciones gastrointestinales, capacidad de adhesión, autoagregación, capacidad de reducir o excluir microorganismos patógenos y capacidad de coagregación.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Medios de cultivo

Las composiciones de medios de cultivo y soluciones empleadas en el trabajo se encuentran detalladas en el anexo.

2. Cepas

2.1. Cepas de levaduras

En el presente trabajo fueron empleadas cepas de levaduras aisladas de alimento e intestino de cerdos sanos, pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, cepas RC008; RC009; RC012; RC016.

2.2. Cepas de bacterias patógenas

Para los ensayos de coagregación y producción de sustancias antimicrobianas se utilizaron cepas de bacterias obtenidas del cepario del laboratorio de Micología de la UNRC, aisladas de animales enfermos. Las cepas utilizadas fueron *Escherichia coli* RCB001; *Salmonella* spp. RCB002, LM001 (aislada de vacas con enteritis), LM003 (aislada de galpón avícola) y LM006 (aislada de galpón avícola); *Enterobacter* sp. RCB003; *Staphylococcus aureus* RCB004, LM005 (aislada de oído de perro con otitis) y *Serratia* spp. LM007 (aislada de herida de perro).

3. Aislamiento de levaduras a partir de muestras de diferentes orígenes

3.1. A partir de alimento

Las levaduras fueron aisladas a partir de alimento siguiendo la metodología propuesta por Fraga y col. (2007), con algunas modificaciones. El aislamiento de levaduras se realizó empleando el método de diseminación en placa. Para ello se colocaron 10 g de alimento en 90 mL de agua peptonada estéril, se agitaron 30 min en agitador y se realizaron seis diluciones decimales seriadas. Se inocularon alícuotas de 0,1 mL de cada dilución, por duplicado, en agar extracto de levadura - peptona - dextrosa (YPD). Las placas se incubaron por 48 h a 25°C.

Con el objeto de obtener un cultivo puro se aislaron las diferentes colonias simples de levaduras obtenidas, se repicaron mediante el método de siembra en placas por estrías en agar YPD, se incubaron durante 48 h a 25°C.

3.2. A partir de intestino animal

Fueron seccionados fragmentos de 5 cm de intestino delgado de cerdos lactantes, a los cuales se les realizó un corte longitudinal y se los invirtió, exponiendo la luz intestinal. Cada segmento fue colocado en 150 mL de agua peptonada estéril e incubado durante 48 h a 37°C. Desde este caldo de cultivo se sembró por el método de agotamiento por estrías en placas de Petri conteniendo agar YPD. Las placas se incubaron durante 48 h a 37°C.

Con el objeto de obtener un cultivo puro se aislaron las diferentes colonias simples de levaduras obtenidas repicándolas mediante el método de siembra en placas por estrías por agotamiento en agar YPD y se incubaron durante 48 h a 37°C.

3.3. A partir de materia fecal

Las levaduras fueron aisladas a partir materia fecal siguiendo la metodología propuesta por Gusils y col. (2002), con algunas modificaciones. Se tomaron 10 muestras de 10 g de materia fecal de cerdos lactantes. Cada muestra fue colocada en 90 mL de agua peptonada estéril e incubada durante 48 h a 37°C. Desde este caldo de cultivo se sembró por el método de agotamiento por estrías en placas de Petri conteniendo agar YPD. Las placas se incubaron durante 48 h a 37°C.

Con el objeto de obtener un cultivo puro se aislaron las diferentes colonias simples de levaduras obtenidas repicándolas mediante el método de siembra en placas por estrías por agotamiento en agar YPD y se incubaron durante 48 h a 37°C.

4. Conservación

Para períodos de tiempo prolongados las cepas utilizadas se conservaron por triplicado en una suspensión de glicerol al 30% a -20°C. La recuperación se realizó a partir de dicha suspensión en caldo YPD incubando durante 48 h a 37°C.

Para uso rutinario las cepas se inocularon en tubos inclinados conteniendo agar YPD, los cuales fueron incubados durante 48 h a 25°C y 37°C (de acuerdo a la procedencia de la cepa) y se mantuvieron a 4°C. Estos cultivos fueron resembrados periódicamente a partir de las cepas conservadas en glicerol.

5. Identificación de levaduras

5.1. Identificación morfológica

De cada uno de los aislados de levadura obtenidos se realizó una suspensión en agua peptonada al 0,1% la cual se empleó como inóculo para la siembra, por

duplicado, mediante el método de estrías por agotamiento en diferentes medios de cultivos utilizados para la identificación propuestos por Pitt y Hocking (1999):

- ✓ Agar extracto de malta (MEA) incubado a 25°C: para el estudio de la morfología colonial.
- ✓ Agar extracto de malta (MEA) incubado a 37°C: para determinar el posible crecimiento a temperatura corporal y/o a elevadas temperaturas.
- ✓ Agar Czapek (Cz) incubado a 25°C: para determinar la capacidad de utilizar nitrato como única fuente de nitrógeno.
- ✓ Agar malta acético (AMA) incubado a 25°C: para establecer la resistencia a conservantes.
- ✓ Agar extracto de malta - extracto de levadura - glucosa 50% (MY-50G) incubado a 25°C: para estudiar el crecimiento en reducida actividad de agua y en presencia de alta concentración de hidratos de carbono.
- ✓ Agar extracto de levadura - sal 10% - glucosa 12% (MY10-12) incubado a 25°C: para determinar crecimiento en reducida actividad de agua y en presencia de alta concentración de cloruro de sodio.

Se analizaron los resultados a los tres y siete días de la siembra.

Se observó la presencia o ausencia de crecimiento en los diferentes medios y las características morfológicas coloniales (color, tamaño, aspecto). También se realizó un montaje en fresco desde MEA para observar características microscópicas como tamaño y forma celular, modo de reproducción, disposición de las células (simples, de a pares, en cadenas, formando clusters), presencia de pseudomicelio y producción de ascosporas.

Se logró la identificación en género y especie de cada uno de los aislados por medio de la clave taxonómica propuesta por Pitt y Hocking (1999).

5.2. Identificación molecular de levaduras

La designación de las especies de levadura aisladas fue confirmada por técnicas moleculares de la siguiente manera. La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando un kit maxiDNA (Promega, Madison, WI, EE.UU.), de acuerdo con instrucciones del fabricante. La región entre rARN 18S y rARN 28S fue amplificada utilizando los primers ITS1 y ITS4 (White y col., 1990). Para lograr un mayor polimorfismo, los genes amplificados fueron tratados con enzimas de restricción CfoI, HinfI y HaeIII para la identificación a nivel de especie (Esteve-Zaroso y col., 1999; Granchi y col., 1999). La asignación de las especies se realizó utilizando una base de datos para la identificación de levaduras (yeast-id.com). Las especies de

levaduras con identificación dudosa o no descritas anteriormente, fueron identificadas mediante análisis de secuencias de PCR amplificando la región rARN 5.8S a través de un analizador genético ABI Prism 3100 (Valente y col., 1999). La comparación de las secuencia se realizaron utilizando un BLAST (Basic Local Alignment Tool) dentro del programa de base de datos NCBI (Altschul y col., 1990).

6. Ensayos para la selección de potenciales probióticos

Para la realización de la parte experimental de esta tesis se seleccionaron al azar dos cepas de *S. cerevisiae* aisladas de alimento (RC008 y RC009) y dos cepas de *S. cerevisiae* aisladas de intestino de cerdo (RC012 y RC016).

6.1. Tolerancia a bajo pH

Se seleccionaron 4 cepas de levaduras pertenecientes a la especie *S. cerevisiae* (RC008 y RC009 aisladas de alimento, RC012 y RC016 aisladas de intestino de cerdo) las cuales fueron crecidas en placas de agar YPD se realizó una suspensión en agua peptonada de 10^7 células mL^{-1} , el ajuste de la concentración se realizó mediante recuento en cámara de Neubauer y por recuento de viables en placas con agar YPD. Un mililitro (1 mL) de dicha suspensión se adicionó a 9 mL de caldo YPD pH 2, modificado con ácido clorhídrico, llevando así la concentración final a 10^6 células mL^{-1} . Cada tratamiento fue realizado por duplicado. Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación a 150 rpm. El ensayo se basó en la metodología propuesta por Kühle y col. (2004), con modificaciones.

Transcurridas 4, 8, 12 y 24 h desde el momento de inoculación, se tomó una alícuota de 1000 μL de cada caldo a cada uno de estos tiempos ensayados y se la colocó en un tubo Eppendorf vacío estéril, debidamente rotulado con el número de cepa y tiempo de muestreo correspondiente.

De cada tubo Eppendorf a cada tiempo de muestreo se tomó una fracción para efectuar:

- ✓ Recuento de células totales (viables y no viables)
- ✓ Montaje en fresco para observar características microscópicas
- ✓ Recuento de células viables cultivables en placa, para lo cual fueron tomados 100 μL de cada Eppendorf, se realizaron cuatro diluciones seriadas al décimo y alícuotas de 0,1 mL de cada una de ellas fueron sembradas en superficie, por duplicado, en agar YPD e incubadas durante 24 h a 37°C .
- ✓ Se realizó un control en medio YPD sin el agregado de ácido clorhídrico y se efectuaron las mismas determinaciones que en el tratamiento de YPD pH 2.

Interpretación de resultados: se determinó si transcurrido el tiempo de exposición a bajo pH (representativo a la cavidad estomacal), la concentración celular se mantuvo en el orden del inóculo inicial o hubo variación, si las cepas lograron sobrevivir ante la condición de estrés.

6.2. Tolerancia a las sales biliares

A partir de las cuatro cepas seleccionadas, crecidas en placas de agar YPD se realizó una suspensión en agua peptonada de 10^7 células mL^{-1} , el ajuste de la concentración se realizó mediante recuento en cámara de Neubauer y por recuento de viables en placas con agar YPD. Un mililitro (1 mL) de dicha suspensión se adicionó a 9 mL de caldo YPD suplementado con bilis de buey al 0,5%, pH 6. Se siguió la metodología propuesta por Mourad y Nour-Eddine (2006) con algunas modificaciones.

Se realizó un control en medio YPD sin el agregado de bilis de buey.

Interpretación de resultados: se comparó la concentración celular del inóculo inicial con los recuentos realizados una vez transcurrido el tiempo de exposición a altas concentraciones de bilis, determinándose si las cepas lograron tolerar la condición de estrés.

6.3. Capacidad de atravesar el tracto gastrointestinal

Fue evaluado el efecto sobre la viabilidad celular ante el estrés que supone el paso por el tracto gastrointestinal siguiendo la metodología propuesta por Fernández y col. (2003), con modificaciones. Se simuló este pasaje mediante:

- ✓ Tolerancia a solución salival artificial.
- ✓ Tolerancia a jugo gástrico artificial.
- ✓ Tolerancia a contenido intestinal artificial.

Los microorganismos se desarrollaron en caldo YPD durante 24 h en agitación a 37°C . Se tomaron 100 μL de muestra (M1) de cada cultivo y se la transfirió a un tubo Eppendorf conteniendo 900 μL de agua peptonada (10^{-1}). Se centrifugaron los cultivos, se lavaron con PBS (pH 6.5) estéril y se resuspendieron en 4 mL de solución A (Ver anexo). Se incubaron durante 5 min a 37°C . Luego se tomaron 100 μL de muestra (M2) y se coloraron en Eppendorf con 900 μL de agua peptonada (10^{-1}). Se agregó 8 mL de solución B (Ver anexo) (dilución de muestra 1/3). Se incubó en agitación durante 60 min a 37°C . Se tomaron 100 μL de muestra (M3) y se colocaron en 900 μL de agua peptonada (10^{-1}). Se centrifugaron y luego se

suspendió la muestra en 12 mL de solución C (Ver anexo). Se incubó en agitación durante 60 min a 37°C.

Posteriormente se tomaron 100 µL de muestra (M4) y se colocaron en 900 µL de agua peptonada (10^{-1}).

Se realizaron diluciones seriada de todas las muestras en agua peptonada 0,1 % y se sembraron 100 µL de cada una de las muestras en YPD agar (Figura 5).

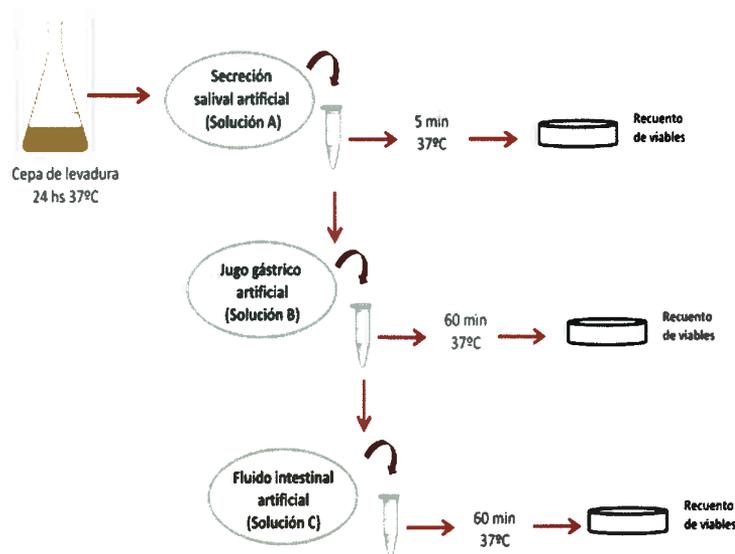


Figura 5: Esquema de metodología para evaluar capacidad de atravesar el tracto gastrointestinal.

6.4. Capacidad de autoagregación

La capacidad de autoagregación se realizó según lo descrito por Kos y col. (2003). Las cepas de levaduras se incubaron durante 24 h a 37°C en 2 mL de caldo YPD. Luego del período de incubación se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min y las células se lavaron con buffer PBS (0,2 M; pH 7,2). Los pellets resultantes se resuspendieron en 2 mL del mismo buffer. Las suspensiones se mezclaron con vórtex durante 30 seg. y la capacidad de autoagregación se evaluó durante 2 h de incubación a 37°C. Luego de este tiempo se extrajo 1 mL de la capa superior y se transfirió a un tubo para medir la densidad óptica (DO), la cual se determinó a 600 nm.

Interpretación de resultados: El porcentaje de autoagregación se expresó como: $1 - (At/A0) \times 100$, donde At representa la DO a tiempo $t=2$ hs y la A0 representa la DO

a $t=0$. En la Tabla 2 se describe el criterio establecido para la interpretación de los posibles resultados.

Tabla 2: Ensayo de autoagregación de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Resultado	Observación
(-)	% Agregación ≤ 60
(+)	% Agregación $< 80 > 60$
(++)	% Agregación ≥ 80

6.5. Capacidad de coagregación con microorganismos patógenos

En este ensayo se evaluó la capacidad de coagregación de las levaduras con diferentes cepas de microorganismos patógenos intestinales de animales: *Escherichia coli* RCB001, *Staphylococcus aureus* RCB004, *Enterobacter* sp. RCB003 y *Salmonella* sp. RCB002. La metodología empleada fue la descrita por Boris y col. (1998) con modificaciones.

Se realizaron suspensiones en PBS 1M pH 6,2 de cultivos tanto de las cepas de levaduras como de los patógenos, ajustando la concentración final de ambos a 10^9 cél mL^{-1} por comparación de turbidez con el tubo 4 de la escala de McFarland. En tubos estériles se mezclaron en la proporción uno a uno (1:1) cada levadura con cada uno de los microorganismos patógenos por separado. Se incubaron durante 4 h a 37°C con agitación (250 rpm). Transcurrido el tiempo de incubación se realizó un frotis a partir de cada uno de los tubos, se los coloreó con tinción de Gram y se los observó al microscopio óptico.

Interpretación de resultados: se consideró la existencia de coagregados cuando las células estuvieran muy próximas a los microorganismos patógenos a modo de "clusters" y ausencia de coagregación cuando ambos microorganismos se observan libremente. En la Tabla 3 se describe el criterio establecido para la interpretación de los posibles resultados.

Tabla 3. Ensayo de coagregación de levaduras con microorganismos patógenos.

Resultado	Observación
(-)	Ausencia de coagregación en 5 campos observados al azar
(+d)	Presencia de coagregación en solo 1 campo de 5 observados al azar
(+)	Presencia de coagregación en 2 ó 3 campos de 5 observados al azar
(++)	Presencia de coagregación en 4 ó 5 campos de 5 observados al azar

6.6. Producción de sustancias antimicrobiana

Se empleó el método de estrias cruzadas propuesto de Teo y Tan (2005) con algunas modificaciones. Esta técnica permitió detectar la existencia de sustancias antimicrobianas por la inhibición del crecimiento del microorganismo patógeno.

Se prepararon cultivos en caldo YPD de cada cepa de levadura. Se incubaron a 37°C en cultivo de toda la noche. Se sembraron en placas de Petri conteniendo agar YPD mediante una estria central y se incubaron a durante 48 h a 37°C.

Luego se adicionó una capa de agar nutritivo en cada una de las placas y se dejó solidificar. Paralelamente se resuspendieron las diferentes cepas patógenas a probar en agua peptonada, por separado.

Las bacterias patógenas ensayadas *Escherichia coli* RCB001; *Salmonella* sp. RCB002, LM001, LM003 y LM006; *Enterobacter* sp. RCB003; *Staphylococcus aureus* RCB004, LM005 y *Serratia* LM007 se sembraron en estrias perpendiculares a la central de la cepa productora. Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C. Cada tratamiento fue realizado por duplicado.

Interpretación de resultados: se consideró la presencia o ausencia de inhibición del crecimiento de los microorganismos patógenos. En la Tabla 4 se describen los posibles resultados.

Tabla 4- Ensayo de producción de sustancias antimicrobianas de las levaduras.

Resultado	Observación
(-)	Zona de inhibición ≤ 3 mm
(+)	Zona de inhibición ≤ 9 mm y ≥ 3 mm
(++)	Zona de inhibición ≤ 15 y ≥ 10 mm

6.7. Ensayo de adhesión a líneas celulares

Se empleó el método de ensayo de adhesión propuesto por Kumura y col. (2004) con algunas modificaciones. Se utilizó la línea celular Vero, la cual fue obtenida del laboratorio de Virología de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Inicialmente las células se desarrollaron a 37°C, hasta observar la presencia de una monocapa. Posteriormente fueron lavadas tres veces con PBS estéril (pH 7,0 ± 0,2). Se tomaron 5 mL de cultivo de cada una de las cepas, los cuales fueron centrifugados y lavados con PBS estéril (pH 7,0 ± 0,2), luego fueron resuspendidas en medio mínimo esencial (DMEM) (ver anexo). Las cepas de levaduras se incubaron en medio YPD durante 24 h a 37°C a 150 rpm; luego se centrifugaron y lavaron 2 veces con PBS. Posteriormente 1 mL de cada cepa de levadura ($1 \times 10^{6-7}$ cél mL⁻¹) fueron inoculadas en las células Vero. La mezcla fue incubada durante 90 min a 37°C, luego la monocapa fue lavada 4 veces con PBS estéril (pH 7,0 ± 0,2), a continuación se realizó una coloración con solución de Giemsa y metanol, durante 5 min. Se lavaron las muestras para retirar el exceso de colorante.

Interpretación de los resultados: Las células fueron observadas al microscopio óptico contando el número de células adheridas a las células Vero en 20 campos microscópicos aleatorios. La capacidad de adhesión se expresó como el N° de levaduras adheridas a 100 células Vero (Kumura y col., 2004).

7. Análisis estadístico

El número de colonias obtenidas a partir del ensayo de resistencia al tracto GI y adhesión a células Vero por *S. cerevisiae* fueron sometidos al análisis de la varianza (ANOVA). El número de colonias obtenidas desde el análisis de las condiciones GI y el número de células de levaduras adheridas a células Vero fueron transformados utilizando la función logarítmica $\log_{10}(x+1)$ antes de la aplicación del análisis de la varianza (ANOVA). Las medias fueron comparadas de acuerdo al test de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) (Quinn and Keough 2002). El análisis se realizó utilizando el programa PROC GLM de SAS (SAS Institute, Cary, NC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Aislamiento e identificación de levaduras

En el presente trabajo las diferentes cepas de levaduras fueron aisladas de ecosistema animal. Se considera que el aislamiento, la caracterización y el origen son importantes en la selección de los microorganismos beneficiosos, ya que esto indica, presumiblemente, la seguridad de la cepa (Klaenhammer y Kullen, 1999).

Luego del procesamiento de las muestras, a partir del medio YPD fueron obtenidas diferentes colonias, que presentaron la morfología macroscópica de levaduras, es decir colonias grandes (aprox. 1-2 mm de diámetro), convexa, lisa, de bordes definidos, brillantes y de aspecto mantecoso. Las levaduras fueron identificadas, mediante la clave taxonómica propuesta por Pitt y Hocking (1997) (Anexo). En la Figura 6 se muestran algunas de las marchas de identificación. Los resultados de la identificación de las diferentes levaduras aisladas a partir de alimento, intestino y materia fecal de cerdo se observan en la Tabla 5.

Se aislaron un total de 25 cepas de levaduras, el 44,4% de las levaduras aisladas de alimento correspondió a la especie *Issatchenkia orientalis* (teleomorfo de *Candida krusei*), el 22,2% a la especie *S. cerevisiae* y el 33,4% restante de las levaduras estuvo representado por cepas de *Trichosporon asahii* (11,1%); *Criptococcus sp* (11,1%) y *Pichia guillermondii* (11,1%). De las cepas obtenidas de intestino, 3 fueron *S. cerevisiae* y una cepa estuvo representada por la especie *Issatchenkia orientalis*. A partir de la muestras de materia fecal se obtuvieron 3 cepas correspondientes a la especie *Clavispora lusitaniae* y 8 cepas correspondientes a la especie *Candida catenulata*. Estos resultados son comparables con los encontrados por Marrero y col. (2005), quienes lograron aislar 24 cepas de levaduras a partir del ecosistema ruminal. En un estudio de Van Uden y col. (1958) donde realizaron aislamientos de microorganismos a partir de muestras de intestinos de diferentes animales de producción, observaron que la ocurrencia de levaduras fue más frecuente (88,8 %) en el ciego de cerdos (caballos 52,4%, bovinos 46,8%, ovejas y cabras 6,4%), las levaduras más abundantes pertenecieron a los géneros: *Cándida*, *Saccharomyces* y *Pichia*.

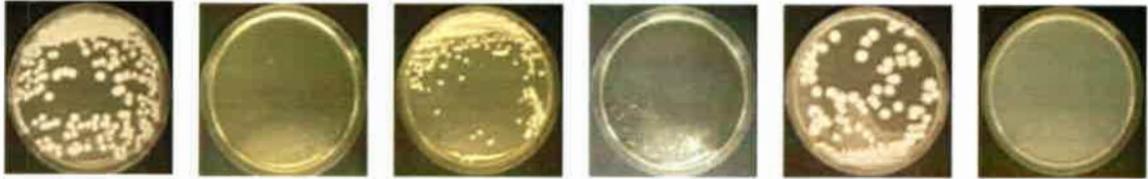
La identificación morfológica permitió clasificar en forma certera a las especies de los aislados de levaduras ya que la caracterización molecular en la mayoría de los casos corroboró el género y especie informados (la especie *S. cerevisiae* o el teleomorfo *Candida krusei* y su anamorfo *Issatchenkia orientalis*), en pocos casos sólo el género (*Candida krusei* - *C. catenulata*) con una especie diferente, y sólo dos fueron clasificadas como pertenecientes a otros géneros (*Candida parapsilopsis* - *Trichosporon asahii* / *C. parapsilopsis* - *Pichia guillermondii*). Se seleccionaron las cepas *S. cerevisiae* RC008 y RC009 (alimento), RC012 y RC016 (intestino) para realizar el proceso de caracterización. Esta especie es considerada el modelo eucariota por excelencia, es uno de los organismos más estudiados y mejor caracterizados y es el primer organismo eucariota del cual se conoció la secuencia completa del genoma (Goffeau y col., 1996). Por otro lado, su amplio conocimiento, así como la facilidad para cultivarla y manipularla, ha hecho de esta levadura una herramienta fundamental en el campo de la biotecnología, mientras que en el sector agroalimentario tiene el estatus de levadura "GRAS" (Generally Regarded As Safe).

Tabla 5. Identificación morfológica y molecular de levaduras.

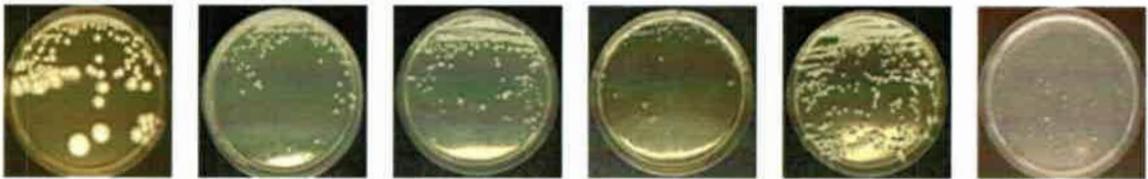
Origen	Especie (Identificación morfológica)	Cepa	Especie molecular)	(Identificación
	<i>Candida parapsilopsis</i>	RC001	<i>Trichosporon asahii</i>	
	<i>C. parapsilopsis</i>	RC002	<i>Pichia guilliermondii</i>	
	<i>Candida krusei</i>	RC003	<i>Issatchenkia orientalis</i>	
	<i>C. krusei</i>	RC004	<i>I. orientalis</i>	
Alimento	<i>C. parapsilopsis</i>	RC005	<i>Criptococcus sp</i>	
	<i>C. krusei</i>	RC007	<i>I. orientalis</i>	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	RC008	<i>S. cerevisiae</i>	
	<i>S. cerevisiae</i>	RC009	<i>S. cerevisiae</i>	
	<i>C. krusei</i>	RC011	<i>I. orientalis</i>	
	<i>S. cerevisiae</i>	RC012	<i>S. cerevisiae</i>	
Intestino	<i>C. krusei</i>	RC013	<i>I. orientalis</i>	
	<i>S. cerevisiae</i>	RC014	<i>S. cerevisiae</i>	
	<i>Torulopsis holmii</i>	RC016	<i>S. cerevisiae</i>	
	<i>S. cerevisiae</i>	RC017	<i>Clavispora lusitaniae</i>	
	<i>C. krusei</i>	RC018	<i>Candida catenulata</i>	
	<i>C. krusei</i>	RC019	<i>C. catenulata</i>	
	<i>C. krusei</i>	RC022	<i>C. catenulata</i>	
	<i>C. krusei</i>	RC024	<i>C. catenulata</i>	
Materia fecal	<i>S. cerevisiae</i>	RC025	<i>C. lusitaniae</i>	
	<i>C. krusei</i>	RC026	<i>C. catenulata</i>	
	<i>C. parapsilopsis</i>	RC027	<i>C. catenulata</i>	
	<i>S. cerevisiae</i>	RC028	<i>C. catenulata</i>	
	<i>S. cerevisiae</i>	RC029	<i>C. lusitaniae</i>	
	<i>C. krusei</i>	RC030	<i>C. catenulata</i>	
	<i>C. krusei</i>	RC031	<i>C. catenulata</i>	



Saccharomyces cerevisiae



Candida krusei



Candida parapsilopsis

Figura 6.- Marcha de identificación en los diferentes medios de cultivo propuestos por Pitt y Hocking (1997). De izquierda a derecha: MEA, MY10-12, AMA, MY50G, MEA37°C y Cz.

2. Ensayos para la selección de potenciales probióticos

2.1. Capacidad de atravesar el tracto gastrointestinal

Una de las características que debe presentar un probiótico es su capacidad de sobrevivir y proliferar metabólicamente activo en el sitio blanco, para lo cual deberá resistir a la presencia de enzimas digestivas, pH ácido, jugo gástrico, pancreático y bilis (Klaenhammer y Kullen, 1999). La supervivencia de las cepas probióticas ingeridas, en las diferentes porciones del tracto gastrointestinal, difiere una de otra. Algunas son rápidamente inhibidas en el estómago mientras que otras pueden llegar hasta el intestino en altas concentraciones (Marteau y col., 1993). Muchos modelos *in vitro* que predicen los daños consisten en pruebas simples las cuales ensayan la sensibilidad del microorganismo a la presencia de ácido, bilis y secreciones del aparato digestivo (Marteau y col., 1997).

En el presente trabajo se realizó primeramente un ensayo de resistencia a condiciones ácidas (pH 2) y a la presencia de sales biliares (0,5 %) y luego se representó el pasaje por el tracto GI mediante: tolerancia a condiciones salivares, gástricas e intestinales.

La tolerancia a la presencia de las sales biliares es considerada un prerrequisito para la colonización y actividad de la cepa probiótica en el intestino delgado del hospedador (Havenaar y col., 1992). Por tal motivo, al evaluar el uso potencial de las levaduras como un efectivo probiótico es necesario evaluar su habilidad de resistir los efectos de la presencia de bilis (Lee y Salminen, 1995).

Los resultados obtenidos en este estudio para la prueba de tolerancia a la presencia de sales biliares se observan en la Tabla 6 en donde se informan los recuentos (\log_{10} UFC mL⁻¹) de las 4 cepas seleccionadas luego de 12 h de incubación a 37 °C. El 100% de las cepas ensayadas toleraron la presencia de bilis en una concentración de 0,5%, el inóculo inicial fue de 10⁵⁻⁶ UFC mL⁻¹, y se evidenció un aumento de 2-3 unidades logarítmicas después del tiempo de incubación.

Kühle y col. (2005) demostraron que el 65% de las cepas de *S. cerevisiae* lograron crecer en presencia de bilis (0,3%) luego de 4 hs de exposición. De la totalidad de las cepas de *Bifidobacterias* analizadas por Liu y col. (2007), el 10% fueron inhibidas ante 0,3% de bilis, su crecimiento declinó dos logaritmos. Más aún se notó este comportamiento ante una concentración de 0,5% donde el 84% no sobrevivió. Un resultado similar fue presentado por Gusils y col. (2002), quienes observaron que el 85% de *L. acidophilus* y *Enterococcus faecium* aislados de

heces de cerdos, no sobrevivió a una mínima concentración de 0,1% de bilis durante 24 h. Según lo informado por Draksler y col. (2004) sólo el 4,5% de las bacterias ácido lácticas ensayadas para emplearlas como probióticos en alimentos destinados a cabras presentaron crecimiento ante una concentración de 0,3% de bilis.

De acuerdo a los resultados de tolerancia a bajo pH presentado en la Tabla 6, se puede evidenciar que el 75% de las cepas sufrieron una significativa disminución de la viabilidad (entre 2-3 log), luego de someterlas a pH 2 durante 12 h a 37°C. Sin embargo, todas las cepas mostraron capacidad de sobrevivir a pH ácido incluso después del tiempo de incubación, resultando coincidente con lo obtenido por Kühle y col. (2005), donde el 100% de las cepas de *S. cerevisiae* evaluadas sobrevivieron 4 horas a pH 2,5. Diferentes resultados a los presentados en este trabajo obtuvieron Charteris y col., (1997) en ensayos a pH 2 donde únicamente el 0,6% de las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* sobrevivieron ante un tiempo de exposición de 3 h. Cuando los ensayos fueron realizados con bacterias ácido lácticas aisladas de heces de cabras, sólo el 4,4% toleraron la acidez (Draksler y col. 2004). En un estudio para el diseño de un probiótico a emplear en alimento de cerdos, el 16% de las bacterias ácido lácticas toleraron la exposición a pH 3 por un período de 3 h (Gusils y col. 2002).

Tabla 6. Efecto de sales biliares y pH ácido en el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$\text{Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$							
	0 h				12 h			
	Bilis 0,5%		pH 2		Bilis 0,5%		pH 2	
RC008	5,25	efg	5,25	defg	8,18	a	3,7	hi
RC009	5,8	de	5,8	de	8,13	a	4,2	hi
RC012	5,89	def	4,9	efg	7,9	a	4,3	gh
RC016	5,4	g	5,71	fg	8,99	a	3,4	j

Los valores con la misma letra no tienen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$).

El efecto del tránsito gastrointestinal simulado sobre la viabilidad de las diferentes cepas de *S. cerevisiae* ensayadas es presentado en la Tabla 7. En general, todas las cepas mantuvieron valores de crecimiento constante durante las condiciones salivares simuladas (M2). *Saccharomyces cerevisiae* RC009 mostró un aumento en la viabilidad durante las condiciones M3 (fluido gástrico) y M4 (contenido intestinal) mientras que RC008 mantuvo un nivel de viabilidad constante. Sólo la cepa RC012 redujo ligeramente su viabilidad con respecto al inóculo inicial, después del tratamiento bajo condiciones GI simuladas. Todas las cepas ensayadas pueden considerarse intrínsecamente tolerantes. Distintos autores han informado resultados similares con cepas de *S. cerevisiae* aisladas de heces de lactantes y queso feta (Psomas y col. 2001) y con cepas de *S. cerevisiae* var *boulardii* aisladas de alimentos destinados a humanos (Van der Kühle y col. 2005). Por el contrario otros autores utilizando bacterias han demostrado un nivel muy bajo de recuperación después de ser sometidas las bacterias a condiciones gastrointestinales *in vitro* (Gusils y col. 2002). Lin y col. (2007) informaron la disminución de 2 o 3 log en cepas de *L. fermentum* aisladas de cerdos y aves de corral.

Tabla 7. Efecto del tránsito gastrointestinal simulado sobre la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae*.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Log ₁₀ UFC mL ⁻¹ durante tránsito GI simulado*			
	M ₁ [†]	M ₂ [‡]	M ₃ [§]	M ₄ ^{**}
RC008	6,4 ± 0,40 a	6,7 ± 0,17 a	6.5 ± 0,06 a	6,8 ± 0,11 a
RC009	6,7 ± 0,23 b	6,4 ± 0,11 b	7.2 ± 0,17 a	7,5 ± 0,21 a
RC012	6,4 ± 0,26 b	6,4 ± 0,21 b	7.3 ± 0,17 a	5,8 ± 0,17 c
RC016	6,9 ± 0,15 b	6,1 ± 0,26 c	7.1 ± 0,15 b	7,5 ± 0,06 a

*Los resultados se muestran como media ± DS (desviación estándar), n=2. Los valores con la misma letra no tienen diferencia significativa (p<0.0001). El análisis estadístico compara las medias entre los tratamientos para cada cepa.

[†]M₁: inóculo inicial

[‡]M₂: ensayo de tolerancia a las condiciones salivares.

[§]M₃: ensayo de tolerancia a las condiciones gástricas.

^{**}M₄: ensayo de tolerancia a las condiciones intestinales.

2.2. Capacidad de agregación

La capacidad de agregación es una de las propiedades buscadas para el establecimiento de un microorganismo como probiótico (Klaenhammer y Kullen, 1999; Alander y col., 1997). En muchos casos está asociada con la capacidad de adhesión que presenta la cepa (Del Re y col., 2000), esta adhesión a la mucosa intestinal demostró ser importante para la modulación de la respuesta inmune del huésped y la exclusión de patógenos tales como *Helicobacter pylori*, *Salmonella* spp., *Listeria* spp. y *Clostridium* spp.. (Alander y col., 1999).

La propiedad de agregar se puede presentar de dos maneras diferentes, como autoagregación, donde aglomeran células de la misma especie y como coagregación, cuando da lugar a la unión de microorganismos diferentes (Jankovic y col., 2003).

La Tabla 8 muestra la capacidad de autoagregación de las cepas de *S. cerevisiae* ensayadas. Los resultados revelaron que las cepas RC008, RC009 y RC016 y mostraron una fuerte capacidad de autoagregación mientras que la cepa RC012 mostró un débil grado de autoagregación.

En este trabajo un alto porcentaje (100%) de las cepas mostraron capacidad de autoagregación; estos resultados coinciden con los obtenidos por Sourabh y col. (2011) quienes observaron la misma capacidad de autoagregación (100%) de cepas de *S. cerevisiae* aisladas de alimentos fermentados (18,47 a 67,65%). Otros investigadores trabajando con bacterias encontraron también un alto porcentaje de autoagregación (61,5%) al realizar estudios de adhesión y agregación en cepas de *B. longum* aisladas de jugo gástrico e intestinal (Del Re y col. 2000). El 100% de las cepas de *Lactobacillus* ensayados por Boris y col. (1998) para emplearlas como agentes de profilaxis en infecciones del aparato urinario, se autoagregaron. De la misma manera,

Por el contrario, solo el 6,6% de las cepas de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Enterococcus*, ensayadas por Draksler y col. (2004), con el propósito de emplearlas como probióticos para ganado caprino, tuvieron la capacidad de autoagregarse. En el estudio para el diseño de un probiótico a emplear en alimento de cerdos, el 2% de las cepas de bacterias lácticas aisladas desde heces de cerdo fueron capaces de agregar (Gusils y col., 2002).

Tabla 8. Capacidad de autoagregación de *Saccharomyces cerevisiae*

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DO ₆₀₀ (t ₀) [†]	DO ₆₀₀ (t ₁) [‡]	1- (DO ₆₀₀ t ₁ / DO ₆₀₀ t ₀) x 100	Agregación [§]
RC008	1,144	0,0885	92,3	++
RC009	1,173	0,0253	97,9	++
RC012	0,974	0,144	85,3	+
RC016	1,099	0,079	92,9	++

[†] Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en PBS hasta llegar a una densidad óptica de 1 (D.O) a 600 nm

[‡] Densidad óptica (D.O.) a 600 nm después de incubación a 37°C durante 2 hs

[§] (++) fuerte; (+) débil; (-) negativo

El rol de protección que ejercen los probióticos contra patógenos gastrointestinales ha recibido especial atención, y es allí donde juega un papel fundamental la capacidad de coagregación (Collado y col., 2007).

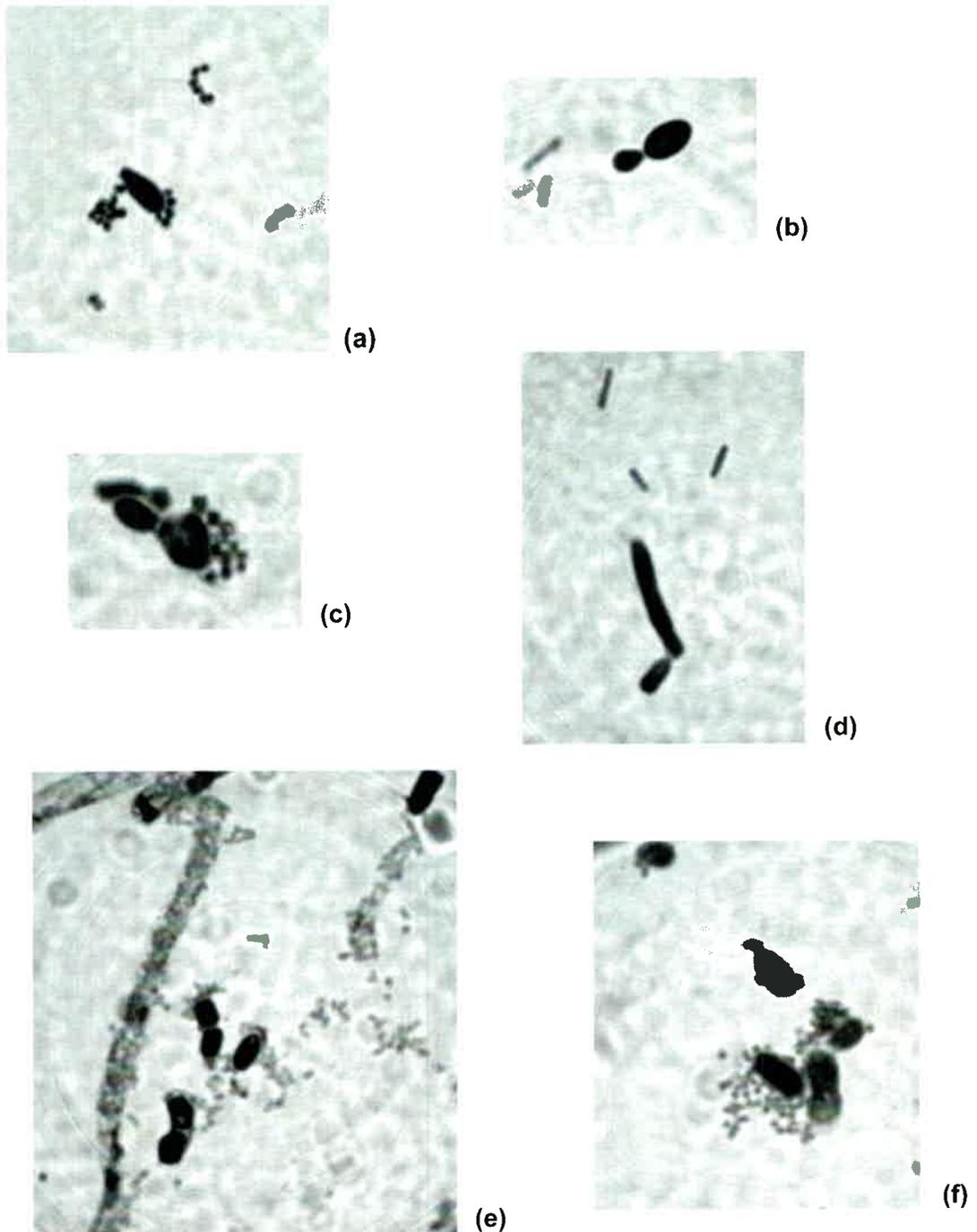
Los resultados de coagregación entre cepas de *S. cerevisiae* y agentes patógenos se muestran en la Tabla 9. Teniendo en cuenta la totalidad de las levaduras ensayadas, el 100% presentó la capacidad de coagregarse con bacterias patógenas. El 100 % de las cepas coagregaron con *S. aureus*, mientras que aproximadamente un 50 % de las cepas coagregó con *E. coli*, *Salmonella* sp. y *Enterobacter* sp. La cepa RC016 fue capaz de coagregarse con todas las cepas patógenas ensayadas. En la Figura 7 se muestran algunos de los resultados obtenidos. Resultados similares a este estudio fueron obtenidos por Boris y col. (1998) quienes observaron que el 100% de los lactobacilos coagregaron con *E. coli*, *C. albicans* y *Gardnerella vaginalis*. Mastromarino y col. (2002) obtuvieron el 70% de coagregación entre lactobacilos y patógenos vaginales humanos (*C. albicans* y *G. vaginalis*). Algunos estudios han intentado establecer el modo en que las levaduras logran unirse a las bacterias. Gedek (1999) informó que cepas de *E. coli* enteropatógena, *Salmonella typhimurium* y *S. enteritidis* se unían a *S. cerevisiae* por receptores tipo lectina dependientes de manosa o derivados de éstas, presentes en la pared celular de la levadura, resultados comparables con los hallados por Pérez Sotelo y col. (2005) en los cuales se observó la adherencia de cepas de *Salmonella spp.* a levaduras, verificando que este es un mecanismo usado por algunos microorganismos probióticos para evitar la colonización de la mucosa del intestino por parte de patógenos.

Tabla 9. Ensayo de coagregación entre *Saccharomyces cerevisiae* y cepas patógenas

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Coagregación*			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Salmonella</i> sp.
	RCB004	RCB001	RCB003	RCB002
RC008	2	0	2	0
RC009	1	0	0	1
RC012	1	0	0	1
RC016	2	1	1	1

* El grado de coagregación esta basado en la escala descrita por Mastromarino y col. (2002), desde 0 para coagregación negativa a 3 para máxima coagregación.

Figura 7.- Capacidad de coagregación de *Saccharomyces cerevisiae* con bacterias patógenas.



Resultado +: (a) *S. cerevisiae* RC012 con *Staphylococcus aureus* (c) *S. cerevisiae* RC009 con *S. aureus* (e): *S. cerevisiae* RC016 con *S. aureus* (f) *S. cerevisiae* RC008 con *S. aureus* **Resultado - :** (b) *S. cerevisiae* RC008 con *E. coli* (d) *S. cerevisiae* RC009 con *E. coli*

2.3. Producción de sustancias antimicrobianas

Las levaduras sintetizan, como producto de su metabolismo, diferentes sustancias bioactivas que son antagonicas para la flora circundante tales como amilasas, celulasas, lipasas, fitasas, proteasas, inulinasas y "toxinas killer" (Zhen-Ming y col, 2010). La síntesis de estos compuestos les brinda ciertas ventajas competitivas y permiten la prevalencia en diferentes nichos ecológicos (ambiente intestinal del hombre o animales) con beneficios para el huésped ya que pueden inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos patógenos. Les brinda una ventaja al momento de competir.

La Tabla 10 muestra la actividad antimicrobiana de *S. cerevisiae* contra microorganismos patógenos. De las levaduras ensayadas el 100% presentó actividad antimicrobiana con una o más cepas patógenas. La cepa RC008 produjo inhibición en el crecimiento del 100% de las cepas patógenas; la cepa RC012 produjo inhibición en el 88% mientras que en las cepas RC009 y RC016 se observó inhibición en el 55% de las cepas patógenas probadas. Imágenes que muestran los resultados obtenidos se presentan en la Figura 8.

Aunque no se han realizado estudios *in vitro* sobre la capacidad de levaduras de producir sustancias antimicrobianas, varios trabajos se han realizado en modelos animales o celulares que indican que levaduras como *S. boulardii* ejercen un efecto beneficioso contra diferentes agentes patógenos entéricos, tales como *C. difficile*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *E. coli* (Czerucka y col., 2007). En estudios de producción de sustancias antimicrobianas en bacterias, Draksler y col. (2004) observaron que solamente el 0,7% de las cepas de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Enterococcus*, utilizadas como probióticos en alimento para cabra, presentaron actividad antimicrobiana (contra *S. typhimurium* y *E. coli*). El 99,3% restante no presentó ningún tipo de actividad. El 10% de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas por Gusils y col., (2002) de heces de cerdos presentó actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas indicadoras. Entre ellas, el 90% presentó actividad antimicrobiana sobre la totalidad de las bacterias ensayadas (*Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. cholerae suis*).

Tabla 10. Actividad antimicrobiana de *Saccharomyces cerevisiae* contra cepas patógenas

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Actividad antimicrobiana *								
	Bacterias patógenas								
	<i>E. coli</i> RCB001	<i>Enterobacter</i> sp. RCB003	<i>Salmonella</i> sp. RCB002	<i>Salmonella</i> sp. LM001	<i>Salmonella</i> sp. LM003	<i>Salmonella</i> sp. LM006	<i>Serratia</i> spp. LM007	<i>S. aureus</i> RCB004	<i>S. aureus</i> LM005
RC008	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++
RC009	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-
RC012	+	+	+	-	+	++	+	++	+
RC016	++	++	++	-	-	-	+	-	++

*+, zona de inhibición ≤ 9 mm y ≥ 3 mm; ++, zona de inhibición ≤ 15 y ≥ 10 mm; -, zona de inhibición ≤ 3 mm

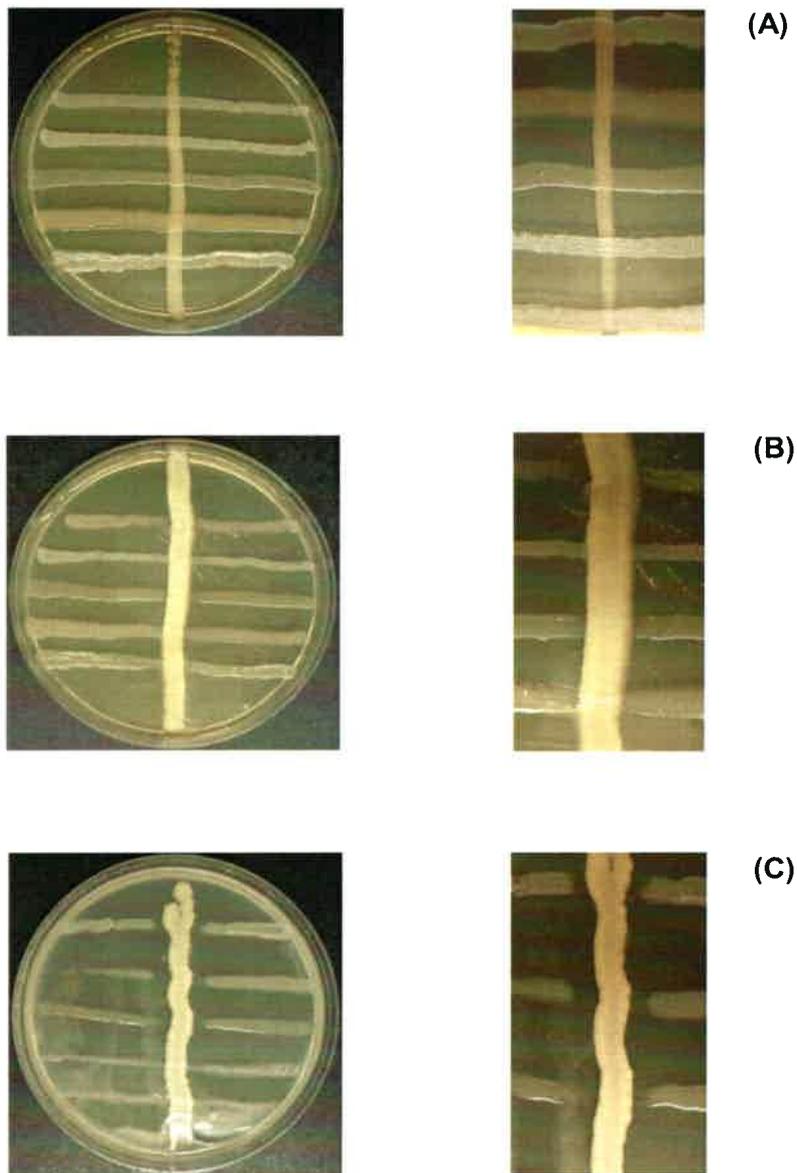


Figura 8. Inhibición de crecimiento de cepas patógenas por *Saccharomyces cerevisiae*. **(A)** Ceba RC009. Resultado negativo. **(B)** Ceba RC012. Resultado positivo. **(C)** Ceba RC008. Resultado positivo.

2.4. Ensayo de adhesión a líneas celulares

Uno de los criterios más importantes para la selección de una cepa potencialmente probiótica es su habilidad para adherirse a la superficie de la mucosa del tracto GI; ya que *in vivo*, las células de levadura se adhieren a los enterocitos evitando que posibles patógenos puedan efectuar la adherencia celular como mecanismo de patogenicidad. La exclusión por medio de la competencia por sitios de adherencia y por sustrato es uno de los mecanismos de acción de las levaduras utilizadas como probióticos (Kumura y col., 2004).

En la Tabla 11 se muestran el número de levaduras adheridas a 100 células Vero a diferentes tamaños de inóculos (10^{6-7} cél mL⁻¹). Los resultados indicaron que la capacidad de adhesión varió entre las diferentes cepas de *S. cerevisiae*; con un inóculo inicial de levaduras de 10^6 cél mL⁻¹, todas las cepas muestran un comportamiento irregular, esto significa que algunas cepas (RC009 y RC012) mostraron una alta adhesión a las células Vero, mientras que el resto (RC008 y RC016) mostraron una capacidad de adhesión baja a moderada. Con un inóculo inicial de levaduras de 10^7 cél mL⁻¹, todas las cepas mostraron una fuerte adhesión a la línea celular ensayada. Las Figuras 9 y 10 muestran el análisis, por microscopía óptica, de adherencia de las cepas RC008 y RC016 a células Vero utilizando solución de Giemsa.

Resultados comparables a los presentados en este trabajo son los obtenidos por Jacobsen y col. (1999), quienes realizaron ensayos de adhesión a células Caco-2 con varias cepas de *Lactobacillus*, donde también observaron variación en la adhesión entre las cepas, 21% de ellas mostró alta adhesión, mientras que el 79% restante mostró baja capacidad de adhesión. Por el contrario, Kumura y col (2004) obtuvieron bajos niveles de adhesión a células Caco-2 por cepas de *S. cerevisiae*. Kulhe y col (2004) informaron alta capacidad de adhesión para dos cepas de *S. cerevisiae* var. *boulardii*, en porcentajes de 16,2 y 18 % y de un 13,6%, para *S. cerevisiae* en células IPEC-J2. Para este estudio se puede concluir que todas las cepas ensayadas fueron capaces de adherirse a la línea celular Vero ($p < 0,05$).

Tabla 11. Adhesión de *Saccharomyces cerevisiae* a células Vero.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Células mL ⁻¹	Número de células de levaduras	
		/100 células Vero [*]	
		Media ± DS [†]	
RC008	10 ⁶	18,5 ± 0,16 f	
	10 ⁷	154 ± 0,09 ab	
RC009	10 ⁶	107,3 ± 0,09 d	
	10 ⁷	178,2 ± 0,02 abcd	
RC012	10 ⁶	109,5 ± 0,13 bcd	
	10 ⁷	154,8 ± 0,26 abcd	
RC016	10 ⁶	48,9 ± 0,04 e	
	10 ⁷	105,9 ± 0,15 cd	

^{*}Fueron analizados veinte campos microscópicos aleatorios, por muestra. Cada ensayo de adhesión se llevó a cabo por duplicado. La adhesión fue expresada como la media del número de levaduras adheridas a 100 células Vero.

[†]Media ± Desviación estándar

[‡] Los valores correspondientes a la misma letra no difieren significativamente de acuerdo a la prueba LSD de Fisher (p<0,05).

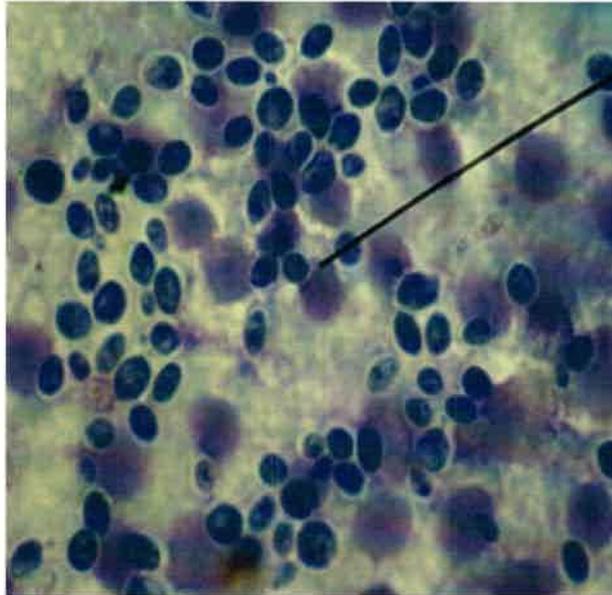


Figura 9: Análisis de adherencia por microscopía óptica (40X) de *Saccharomyces cerevisiae* RC008 a células Vero con colorante de Giemsa

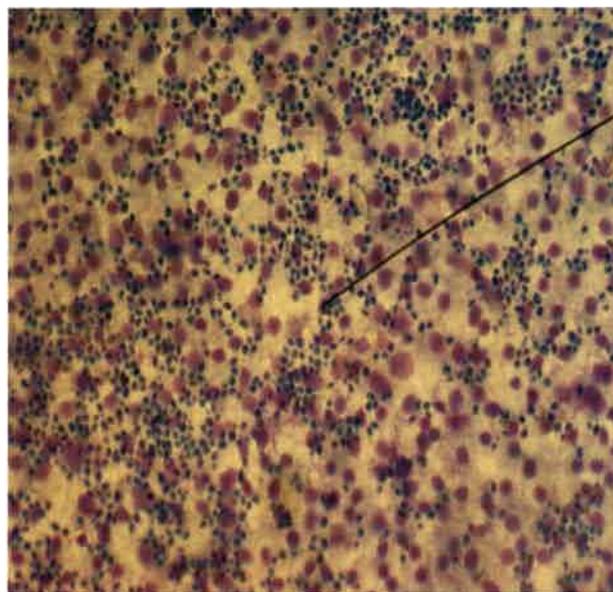


Figura 10: Análisis de adherencia por microscopía óptica (10X) de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 a células Vero con colorante de Giemsa

CONCLUSIONES PARCIALES

Cepas de *S. cerevisiae* autóctonas del ecosistema de producción animal fueron capaces de tolerar el tránsito gastrointestinal simulado y demostraron su potencialidad probiótica.

La levadura *S. cerevisiae* RC016 y RC008 resultan promisorias para ser utilizadas como aditivo alimentario con propiedades benéficas ya que fueron tolerantes al pasaje por el tracto gastrointestinal artificial; mostraron un alto grado de autoagregación y de coagregación con cepas patógenas; produjeron inhibición en el crecimiento de patógenos y tuvieron una fuerte adhesión en cultivo celular.

Sección II

Estudio de las propiedades adsorbentes de micotoxinas de *Saccharomyces cerevisiae* nativas del medioambiente animal.

INTRODUCCIÓN A LA SECCIÓN

Las micotoxinas afectan al rendimiento en la producción animal, por la disminución del valor nutritivo del alimento y por el impacto negativo que produce en la salud de los animales. La contaminación por micotoxinas reduce la palatabilidad de los alimentos generando bajos niveles de ingestión que exacerban los problemas de rendimiento y/o toxicidad en los animales que los consumen.

Cada micotoxina tiene su efecto particular, y pueden producir efectos crónicos o agudos, dependiendo de la concentración y los tiempos que está expuesto el animal. La co-contaminación por uno o varios tipos de micotoxina se produce de manera natural y ejerce un mayor impacto negativo en la salud y la productividad del ganado. Los efectos de las micotoxinas van desde la reducción en la ingestión de alimentos, la mala conversión del alimento hasta una incapacidad general de un animal para desarrollarse. Los síntomas varían según la toxina. Los síntomas agudos de micotoxicosis son a menudo relativamente fáciles de identificar. Sin embargo, los síntomas crónicos entre los que se incluyen la ligera disminución del rendimiento y/o la inmunosupresión pueden redundar en mayores pérdidas económicas.

La decontaminación biológica mediante la utilización de microorganismos es una de las estrategias utilizadas. Algunas bacterias integrantes de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) que se utilizan ampliamente en la fermentación de los alimentos poseen estructuras en la pared celular con capacidad para adherir micotoxinas (Shetty y Jespersen, 2006, Stanley y col., 1993, Celik y col., 2005).

En estudios anteriores se ha demostrado que las condiciones de cultivo tales como el pH, la temperatura, la oxigenación, la naturaleza del medio, la concentración o la naturaleza de la fuente de carbono, modulan la cantidad y las propiedades estructurales de los β -D-glucanos, mananos y quitina que se sintetizan (Aguilar-Uscanga y col. 2003). Estos oligosacáridos β 1 -3 glucano y manano-proteínas parecen ser el sitio de unión a las AFs, FBs, ZEA y OTA, es por esto que las condiciones de tracto gastrointestinal (TGI) podrían producir modificaciones estructurales en la pared celular de la levadura influenciando sobre la adsorción de micotoxinas y disminuyendo su biodisponibilidad en el tracto GI del animal.

Estudios moleculares que se llevaron a cabo para determinar los enlaces químicos que se establecen entre las micotoxinas y la pared celular de las levaduras, identificaron uniones relativamente débiles como enlaces de hidrógeno, interacciones de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas entre las micotoxinas y los beta-glucanos de la pared celular de las levaduras, por lo que la capacidad de adsorción de cepas de levaduras varía en diferentes condiciones de pH y temperatura (Yiannikouris y col, 2004).

Las diferencias en la adsorción que se observan entre las diferentes cepas de *S. cerevisiae* cuando son expuestas a diferentes condiciones del medio de cultivo, podrían ser explicadas por la variabilidad estructural de la pared celular de las levaduras.

HIPÓTESIS

✓ Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas tienen propiedades decontaminante de micotoxinas, *in vitro*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Determinar la capacidad de adsorción de micotoxinas (AFB₁, ZEA y OTA) de las cepas de levaduras aisladas.

✓ Estudiar el efecto de las condiciones gastrointestinales sobre las cepas de *S. cerevisiae* en la adsorción de micotoxinas.

✓ Evaluar el tamaño de la pared celular de las cepas de *S. cerevisiae* a través de microscopía electrónica e identificar si existe una relación directa con la capacidad de adsorción de las micotoxinas estudiadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Medios utilizados

Para el mantenimiento de las cepas y para el recuento de microorganismos viables se utilizó agar YPD.

Para la producción de inóculos se utilizó caldo YPD y para la conservación de las cepas, glicerol al 30%.

2. Cepas de levaduras

En la presente Sección fueron empleadas cepas de levaduras procedentes de ensilaje e intestino de cerdo pertenecientes a las especies: *Saccharomyces cerevisiae*, cepas: RC008; RC009; RC012; RC016

3. Preparación del inóculo

Cada una de las cepas de levaduras estudiadas se inoculó en un tubo de ensayo con 5 mL de caldo YPD y se incubó a una temperatura de 37°C durante 24 hs. La concentración celular se midió por medio de una cámara de Neubauer y se estableció en 10^7 células mL^{-1} para todas las cepas ensayadas.

4. Adsorción de micotoxinas

4.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

Las cepas de *S. cerevisiae* fueron incubadas en caldo YPD a 37°C en agitación, durante 24 h. Luego se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado dos veces con solución fisiológica.

4.2. Soluciones

Las soluciones de AFB₁, ZEA y OTA se detallan en el Anexo.

4.3. Ensayos de adsorción

Se realizó la técnica de adsorción de toxinas de acuerdo a la metodología propuesta por Bueno y col. (2007) con modificaciones.

Los pellets de *S. cerevisiae* (10^7 cél mL^{-1}) se resuspendieron en 1 mL de solución de PBS conteniendo concentraciones variables de OTA (1, 5, 10, 40 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), AFB₁

(50, 100 y 500 ng mL^{-1}) y ZEA (1, 5, 20 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Se incubaron a 37°C durante 10 min. Las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes conteniendo la toxina remanente fueron recolectados y conservados a -20°C hasta su análisis cuantitativo por HPLC.

Entre todos los tratamientos se incluyó un control de la solución de trabajo de la micotoxina a las diferentes concentraciones ensayas. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

4.3.1. Cuantificación de aflatoxina B₁ por HPLC

Aflatoxina B₁ fue detectada y cuantificada de acuerdo a la metodología propuesta por Trucksess y col. (1994) Las condiciones de la corrida cromatográfica fueron: columna C18 Luna (150 x 4,6 mm, 5 μm); detector de fluorescencia: excitación 360 nm, emisión 440 nm; fase móvil, agua:acetonitrilo:metanol (4:1:1 v/v); flujo 1,5 mL/min; volumen de inyección 250 μL y el tiempo de retención fue de 11 min. Se realizó una curva de calibración con testigos de AFB₁ (Sigma). La cuantificación de la toxina fue obtenida por comparación de las respectivas áreas (testigos y muestras). Las muestras de los sobrenadantes y testigos fueron derivatizados previo a la inyección con 200 μL de muestra + 700 μL de solución derivatizante (Anexo). Se mantuvieron en reposo durante 10 min, luego se calentaron a 65°C en baño de agua durante 8,5 min y se enfriaron a temperatura ambiente.

4.3.2. Cuantificación de zearalenona por HPLC

Zearalenona fue detectado y cuantificado de acuerdo a la metodología propuesta por Cerveró y col. (2007). Las condiciones de la corrida cromatográfica fueron: columna C18 Luna (150 x 4,6 mm, 5 μm); detector de fluorescencia: excitación 280 nm, emisión 460 nm; fase móvil, MeOH:H₂O (70:30); flujo 0,7 mL min⁻¹; volumen de inyección 20 μL , el tiempo de retención fue de 4 min y el límite de detección fue de 3 ppb.

4.3.3. Cuantificación de ocratoxina A por HPLC

El equipo de HPLC usado para la detección y cuantificación de OTA fue un cromatógrafo Hewlett Packard con un loop de 20 μL , equipado con un detector de fluorescencia (excitación λ_{exc} 330 nm ; emisión λ_{em} 460 nm) y una columna C18 (Supelcosil LC-ABZ, Supelco; 150 mm, 4.6 mm, 5 mm particle size) conectada a un precolumna (Supelguard LC-ABZ, Supelco; 20 mm, 4,6 mm, 5 mm particle size). La

fase móvil fue inyectada a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ y consistió en un sistema isocrático constituido por: 57% acetonitrilo, 41% agua y 2% ácido acético. Ocratoxina A fue cuantificada sobre la base de la respuesta fluorométrica, comparada con un estándar de OTA (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA; purity >99%). El límite de detección (LOD) del método empleado fue $0,1 \text{ ng g}^{-1}$.

4.4. Efecto de la exposición de condiciones gastrointestinales sobre la adsorción de micotoxinas

4.4.1. Efecto de la exposición a pH ácido y sales biliares en la adsorción de ocratoxina A.

Para determinar el efecto de la exposición a pH ácido y a la presencia de sales biliares, a partir de cada una de las cepas aisladas crecidas en placas de agar YPD se realizó una suspensión en agua peptonada de 10^7 células mL^{-1} , el ajuste de la concentración se realizó mediante recuento en cámara de Neubauer y por recuento de viables en placas con agar YPD. Un mililitro (1 mL) de dicha suspensión se adicionó a 9 mL de caldo YPD pH 2 modificado con ácido clorhídrico y a 9 mL de caldo YPD suplementado con bilis de buey al 0,5%, pH 6. Cada tratamiento fue realizado por duplicado. Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación a 150 rpm durante 4 hs. El ensayo se basó en la metodología propuesta por Olejnik y col. (2005) y por Hernández-Mendoza y col. (2009).

Transcurridas las 4 h de incubación se realizó el ensayo de adsorción de OTA como se detalló anteriormente (4.3.).

4.4.2. Efecto de la exposición a condiciones gastrointestinales simuladas en la adsorción de aflatoxina B₁ y zearalenona.

- ✓ Tolerancia a solución salival artificial.
- ✓ Tolerancia a jugo gástrico artificial.
- ✓ Tolerancia a contenido intestinal artificial.

Previo al ensayo de adsorción de AFB₁ y ZEA, las células fueron sometidas a condiciones gastrointestinales simuladas como se detalla a continuación:

Los microorganismos se sembraron en caldo YPD durante 24 h en agitación a 37°C. Se tomaron 100 µL de muestra de cada cultivo y se los transfirió a un tubo Eppendorf conteniendo 900 µL de agua peptonada (10^{-1}). Se centrifugaron los cultivos, se lavaron con PBS (pH 6.5) estéril y se resuspendieron en 4 mL de solución salival artificial (Anexo). Se incubaron durante 5 min a 37°C. Se agregaron 8 mL de jugo gástrico artificial (Anexo). Se incubó en agitación durante 60 min a 37°C. Se centrifugó y luego se suspendió la muestra en 12 mL de contenido intestinal artificial (Anexo). Se incubó en agitación durante 60 min a 37°C (Fernández y col., 2007). Posteriormente, se realizó el ensayo de adsorción de micotoxinas siguiendo la metodología propuesta por Bueno y col. (2007), como se detalla en el punto 4.3.

5. Determinación del tamaño de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* por Microscopía

Este ensayo fue realizado como servicio por la Dra. Andrea Cristofolini en el laboratorio de microscopía electrónica de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UNRC.

5.1. Microscopía electrónica

Para realizar el estudio de microscopía electrónica de transmisión (TEM), las muestras de *S. cerevisiae* RC008, RC009, RC012 y RC016 fueron fijadas en glutaraldehído al 2,5% en 0,2 M de S-colidina pH 7,4, luego se realizó una post fijación en tetróxido de osmio al 1% en 0,2 M de S-colidina pH 7,4, se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona, fueron embebidas en resina y se seccionaron en un ultramicrotomo. Estas secciones ultradelgadas (60nm) fueron cortadas y colocadas en rejillas de cobre, contrastados con acetato de uranilo saturado y citrato de plomo acuoso. Las secciones fueron examinadas en el microscopio electrónico de transmisión Elmiskop 101 (Siemens, Alemania). Los pellets de levadura se obtuvieron por centrifugación después de cada paso.

5.2. Microscopía de alta resolución

Para realizar el estudio de microscopía de alta resolución fueron utilizadas las secciones semidelgadas ($\pm 0,25 \mu\text{m}$) de las muestras de cada cepa de *S. cerevisiae* analizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las secciones semi-

delgadas fueron contrastadas con azul de toluidina acuoso y se cubrieron en un agente de embebido-DPX (Merck, Alemania). Las secciones se observaron en un microscopio de luz Axiophot (Carl Zeiss, Thornwood, NY) equipado con una cámara digital de alta resolución (Powershot G6, 7,1 megapíxeles Canon Inc, Japón). Las imágenes digitales fueron capturadas con el software Axiovision 4.6.3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Adsorción de micotoxinas

La capacidad de las cepas de *S. cerevisiae* para adsorber AFB₁ se muestra en la Tabla 12. Los porcentajes de adsorción de AFB₁ variaron entre las diferentes cepas y las concentraciones de AFB₁ utilizadas. Los porcentajes de adsorción oscilaron entre 16,4 y 82% para una concentración de AFB₁ de 50 ng mL⁻¹. Cuando la concentración de AFB₁ fue de 100 ng mL⁻¹, el porcentaje de adsorción varió entre 21,3 y 79%, y entre 20,2 y 73,2% para una concentración de 500 ng mL⁻¹ de AFB₁.

En todas las concentraciones de AFB₁, la cepa RC016 mostró un alto porcentaje de adsorción (48-82%), seguida por la cepa y RC008 (38-67%).

La capacidad de *S. cerevisiae* de adsorber AFB₁ fue evaluada en este trabajo de tesis como una importante propiedad benéfica. El porcentaje de adsorción varió desde 16,4% a 82% según la concentración de AFB₁ evaluada. Previa investigación acerca de los niveles de AFB₁ adsorbidos por cepas de lactobacilos han informado valores que van del 0,6 al 84% (Peltonen y col., 2001; Haskard y col., 2001; Lahtinen y col., 2003; Zinedine y col., 2005). Bueno y col. (2007) informaron resultados similares a los informados en el presente trabajo en relación a la adsorción de AFB₁ por cepas de *S. cerevisiae*. Sin embargo, no informaron porcentajes de adsorción.

Aunque todas las cepas probadas en este estudio fueron capaces de adsorber AFB₁, el nivel de adsorción varió entre las cepas, indicando especificidad natural de cepa para dicha propiedad. Resultados similares fueron obtenidos por investigadores que han examinado la capacidad de diferentes microorganismos para adsorber AFs. Se han informado una amplia gama de géneros, especies y cepas con capacidades específicas de adsorción (Peltonen y col., 2001; Haskard y col., 2001; Lee y col., 2003; Shahin, 2007; Shetty y col., 2007). Asimismo, se ha informado anteriormente que la concentración de microorganismos influye sobre la eliminación de AFB₁ (Shahin, 2007). Dichos autores encontraron que un mínimo de 2-5 x 10⁹ UFC mL⁻¹ son necesario para una significativa remoción de AFB₁ (13-50%), mientras que una concentración de 2 x 10¹⁰ UFC mL⁻¹, es capaz de reducir el nivel de AFB₁ a menos de 0,1 y 13%, según Bolognani y col. (1997) y El-Nezami y col. (1998), respectivamente. Aunque la influencia de la concentración de *S. cerevisiae* en la eliminación de AFB₁ no

ha sido probado aquí, la concentración utilizada en este trabajo (10^7 UFC mL⁻¹) ejerció una efectiva remoción de AFB₁. Según el modelo propuesto por Bueno y col. (2007), este hecho se debe probablemente a que una mayor superficie celular se asocia a un número mayor de sitios de unión por célula. Por lo tanto, las células de levadura, al ser de mayor tamaño que las bacterias, deberían tener mayor capacidad de adsorción por célula. El-Nezami y col. (1998) encontraron que a pesar de que, la cantidad de AFB₁ eliminada aumentó con la concentración de AFB₁, el porcentaje eliminado no fue significativamente diferente. Sin embargo, nuestros resultados afirman que el porcentaje de remoción de AFB₁ es dependiente de la concentración de AFB₁.

La capacidad de cepas de *S. cerevisiae* para adsorber ZEA se resume en la Tabla 13. Al igual que lo observado para la captación de AFB₁, los porcentajes de adsorción de ZEA variaron entre las diferentes cepas y las concentraciones de micotoxina utilizada. Para concentraciones bajas de ZEA (1 y 5 µg mL⁻¹) se observó una variación en el porcentaje de adsorción entre 48 y 87% y para concentraciones altas (20 y 50 µg mL⁻¹) los porcentajes de adsorción variaron entre 41 y 68%. En general la cepa RC009 fue la que mostró mayor capacidad de adsorción a bajas y altas concentraciones de ZEA, La cepa RC012 mostro una alta remoción de la micotoxina a bajas concentraciones (78-87%), mientras que la cepa RC0016 tuvo un alto porcentaje de remoción (51-68%) a altas concentraciones de ZEA (50 µg mL⁻¹). No se observo diferencias significativas entre las 4 cepas, en la adsorción de ZEA a una concentración de 20 µg mL⁻¹ de la toxina.

Resultados similares fueron observados, para cepas BAL cuando se evaluó su capacidad para remover ZEA (88%) (Niderkorn y col., 2006 y El-Nezami y col., 2002). También fueron informados resultados semejantes por Yiannikouris y col. (2004) quienes demostraron la capacidad de adsorción de ZEA a través de pared celular de *S. cerevisiae*.

La capacidad de las cepas de *S. cerevisiae* para adsorber OTA se muestra en la Tabla 14. Los porcentajes de adsorción de OTA variaron entre las diferentes cepas y las concentraciones de la micotoxina utilizada. Los porcentajes de adsorción oscilaron entre 46 y 74% para una concentración de OTA de 1 µg mL⁻¹. Cuando la concentración de OTA fue de 5 µg mL⁻¹, el porcentaje de adsorción varió entre 16 y 39,2%; cuando la concentración de micotoxina fue de 10 µg mL⁻¹, el porcentaje de

adsorción varió entre 14,5 y 59,4%, entre 17,9 y 39,2% para una concentración de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y entre 56,7 y 74,2% para una concentración de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de OTA.

En todas las concentraciones de OTA ensayadas, las cepas RC016 y RC012 mostraron un alto porcentaje de adsorción, seguida por las cepas RC009, y RC008. La capacidad de *S. cerevisiae* de adsorber OTA fue evaluada en este trabajo de tesis como una importante propiedad benéfica. El porcentaje de adsorción varió desde 14,5 y 74,2% según la concentración de OTA y la cepa evaluada. Previas investigaciones acerca de los niveles de OTA adsorbidos por pared celular de levaduras han informado que fue de 12,49% (Dawson y col 1993). Resultados obtenidos por Grunkemeier (1990), demostraron que una mezcla de 40% de células termolisadas y 60% de levaduras viables fueron efectivas adsorbiendo OTA (70%) con una cepa proveniente de ensilaje. Resultados similares a los presentados en este trabajo con cepas de *Saccharomyces spp.* fueron informados por Bejaoui y col. (2004) quienes emplearon cepas de levaduras para la remoción de OTA en jugo de uva y mostraron una adsorción del 90% luego de 5 min de exposición, y por Cecchini y col (2006) quienes estudiaron la influencia de una cepa de levadura durante la fermentación de vino e informaron porcentajes de adsorción de OTA entre 46,8 y 70,1%.

Aunque todas las cepas probadas en este estudio fueron capaces de adsorber OTA, el nivel de adsorción varió entre las cepas, indicando especificidad natural de cepa para dicha propiedad.

Diversos estudios han demostrado que la adsorción de micotoxinas en los sistemas biológicos es un proceso reversible que se puede caracterizar como un equilibrio químico. Como resultado, la adsorción es un proceso dependiente de la concentración de micotoxina, la cantidad de adsorbente, y la afinidad relativa de los adsorbentes por las micotoxinas (Ramos y Hernández, 1996; Grant y Phillips, 1998).

Tabla 12. Niveles de captación de aflatoxina B₁ (ng mL⁻¹ y porcentaje %) por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes concentraciones de toxina.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Concentración de aflatoxina B ₁ adsorbida (ng mL ⁻¹ ± DS) y porcentaje de adsorción (%)		
	50 ng mL ⁻¹	100 ng mL ⁻¹	500 ng mL ⁻¹
RC008	33,8 (67,6%) ± 0,1 ^b	45,6 (43,5%) ± 7,1 ^c	197,9 (38,2%) ± 24,1 ^d
RC009	8,4 (16,4%) ± 0,8 ^d	21,5 (21,3%) ± 0,8 ^d	159,3 (31,8%) ± 1,2 ^a
RC012	15,3 (29,6%) ± 1,6 ^c	21,5 (20,6%) ± 3,1 ^d	103,7 (20,2%) ± 9,4 ^f
RC016	41,6 (82,0%) ± 1,9 ^a	49,1 (48,7%) ± 1,4 ^{bc}	328,8 (65,5%) ± 5,2 ^b

*Las letras en común no son diferentes significativamente de acuerdo al test de la mínima diferencia significativa de Fisher (p < 0,001). El nivel de captación fue estadísticamente analizado por separado para cada concentración.

Tabla 13. Niveles de captación de zearalenona (µg mL⁻¹ y porcentaje %) por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes concentraciones de toxina.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Concentración de zearalenona adsorbida (µg mL ⁻¹ ± DS) y porcentaje de adsorción (%)				
	1 µg mL ⁻¹	5 µg mL ⁻¹	10 µg mL ⁻¹	20 µg mL ⁻¹	50 µg mL ⁻¹
RC008	0.48 (48.0%) ±0.02 ^b	2.83 (56.6%) ± 0.65 ^c	5.67 (56.7%) ± 1.10 ^b	12.35 (61.7%) ± 0.26 ^a	20.6 (41.1%) ± 1.28 ^b
RC009	0.85 (85.0%) ±0.03 ^a	3.64 (72.8%) ± 0.08 ^a	6.72 (67.2%) ± 0.08 ^{ab}	12.81 (64.1%) ± 0.3 ^a	33.39 (66.8%) ± 3.84 ^a
RC012	0.87 (87.0%) ±0.02 ^a	3.90 (78.0%) ± 0.24 ^a	7.12 (71.2%) ± 0.45 ^a	10.41 (52.0%) ± 0.2 ^a	29.18 (58.4%) ± 0.58 ^b
RC016	0.53 (53.0%) ±0.02 ^b	3.03 (60.6%) ± 0.99 ^b	7.42 (74.2%) ± 0.39 ^a	10.35 (51.7%) ± 0.37 ^a	34.33 (68.7%) ± 0.62 ^a

*Las letras en común no son diferentes significativamente de acuerdo al test de la mínima diferencia significativa de Fisher (p < 0.001). El nivel de captación fue estadísticamente analizado por separado para cada concentración.

Tabla 14. Niveles de captación de ocratoxina A ($\mu\text{g mL}^{-1}$ y porcentaje %) por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes concentraciones de toxina.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Concentración de ocratoxina A adsorbida ($\mu\text{g mL}^{-1} \pm \text{DS}$) y porcentaje de adsorción (%)				
	1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	40 $\mu\text{g mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$
RC008	0.46 (46.0%) $\pm 0.07^b$	0.80 (16.0%) $\pm 0.03^b$	1.45 (14.5%) $\pm 0.03^b$	7.17 (17.9%) $\pm 0.03^b$	56.7 (56.7%) $\pm 0.08^b$
RC009	0.43 (43.0%) $\pm 0.05^b$	0.80 (16.0%) $\pm 0.03^b$	4.94 (49.4%) $\pm 0.09^a$	14.95 (37.3%) $\pm 0.05^a$	67.1 (67.2%) $\pm 0.09^a$
RC012	0.63 (63.0%) $\pm 0.04^a$	1.96 (39.2%) $\pm 0.07^a$	5.64 (56.4%) $\pm 0.06^a$	15.68 (39.2%) $\pm 0.05^a$	71.2 (71.2%) $\pm 0.09^a$
RC016	0.74 (74.0%) $\pm 0.06^a$	1.52 (30.4%) $\pm 0.03^a$	5.80 (58.0%) $\pm 0.04^a$	15.68 (39.2%) $\pm 0.05^a$	74.2 (74.2%) $\pm 0.09^a$

*Las letras en común no son diferentes significativamente de acuerdo al test de la mínima diferencia significativa de Fisher ($p < 0.001$). El nivel de captación fue estadísticamente analizado por separado para cada concentración.

2. Efecto de la exposición de condiciones gastrointestinales sobre la adsorción de micotoxinas

2.1. Efecto de la exposición a pH ácido y sales biliares en la adsorción de ocratoxina A.

Los resultados de la influencia de la incubación de las células de levadura en presencia de sales biliares y el pH baja sobre la adsorción de OTA se presentan en la Tabla 15. El valor del pH y la concentración de sales biliares ensayados es representativo de los valores encontrados en el tracto GI de los mamíferos.

La incubación en presencia de 0,5% sales biliares aumentó la adsorción de OTA por las cepas de *S. cerevisiae* examinadas; los más altos niveles de OTA adsorbidos se observaron con las cepas RC009 y RC008. Para estas cepas, la incubación en presencia de sales biliares 0,5% dio lugar a cambios en la captación de OTA respecto de los valores observados en las muestras control ($p < 0,001$).

En todos los casos, las condiciones ácidas de incubación (pH 2) tuvieron un efecto destacable sobre la adsorción de OTA, el efecto fue estadísticamente significativo para las cepas RC008 y RC009. Los niveles de adsorción más altos se observaron con las cepas RC008 y RC009 (82,3 y 80,2%, respectivamente).

Resultados similares a los obtenidos en este estudio mostraron que el tratamiento ácido a células de *S. cerevisiae*, mejoró de manera significativa la remoción de OTA en medio líquido (75%) (Bejaoui y col., 2004). Las condiciones ácidas podrían afectar los polisacáridos de la pared celular mediante la liberación de monómeros. Estos productos liberados podrían ofrecer más sitios de unión y, de esta forma, aumentar la adsorción de OTA. Por otra parte, la disminución del espesor de la pared celular y/o el aumento del tamaño de sus poros bajo el tratamiento con ácido, probablemente podría poner a disposición otros sitios de unión en las células de levadura para la adsorción de OTA (Bejaoui y col., 2004). En otras condiciones, estudios previos han demostrado una alta adsorción de OTA en el estómago de los animales como consecuencia de sus propiedades ácidas (Galtier, 1978; Roth y col. 1988).

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que la exposición de las cepas de *S. cerevisiae* a bajo pH y a la presencia de sales biliares impactaron en la captación de OTA. En general, las cepas de levaduras adsorbieron mayor cantidad de toxina cuando las células fueron expuestas a pH ácido (75,88 a 82,32%) y a la presencia de sales biliares (71,33 a 78,66%).

Tabla 15. Porcentaje de adsorción de ocratoxina A (%) por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas con sales biliares (0,5%) and pH 2.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Adsorción de ocratoxina A (%) ± DS		
	Control	Sales biliares (0,5%)	pH 2
RC008	56,70 ± 24,05 b	74,40 ± 14,4 a	82,32 ± 6,02 a
RC009	67,17 ± 21,27 b	78,66 ± 12,34 a	80,18 ± 7,22 a
RC012	71,21 ± 5,91 a	72,09 ± 15,79 a	76,64 ± 4,51 a
RC016	74,24 ± 4,74 a	71,33 ± 1,33 a	75,88 ± 9,25 a

Control: células incubadas a 37°C en PBS pH7.

TGI: células incubadas a condiciones gastrointestinales simuladas

DS: desviación estándar

Letras distintas indican diferencias significativas LSD de Fisher ($p < 0,001$).

2.2. Efecto de la exposición a condiciones gastrointestinales simuladas en la adsorción de aflatoxina B₁ y zearalenona.

Los resultados de la influencia de la incubación de las células de levadura en condiciones TGI artificiales sobre la adsorción de AFB₁ y ZEA, se presentan en Tabla 16 y Tabla 17, respectivamente.

La incubación de las cepas de *S. cerevisiae* en presencia de condiciones TGI, tuvo efecto sobre la adsorción de AFB₁ en la cepa RC009, donde se observó una disminución significativa en la remoción de la toxina cuando se la comparó con el control y en la cepa RC016 en donde hubo un aumento significativo en el porcentaje de adsorción de la micotoxina cuando las células fueron sometidas a las condiciones del TGI ($p < 0,05$). Mientras que en el ensayo de adsorción de ZEA se observó en todas las cepas, un aumento en la captación de esta micotoxina, cuando las células fueron expuestas a las condiciones del TGI, respecto a los valores observados en las muestras control ($p < 0,05$), exceptuando la cepa RC008 donde no existieron diferencias significativas en la remoción de ZEA en ambos tratamientos. Los niveles de adsorción más altos se observaron con las cepas RC009 y RC016 (97,98 y 57,84%, respectivamente).

Los datos sugieren que la exposición a las condiciones TGI (acidez, presencia de sales biliares, enzimas, etc), en algunos casos, produce una alteración sobre la

pared celular de la levadura que, aumentando los sitios de unión y/o aumentando la biodisponibilidad de ellos, aumenta la captación de la micotoxina.

Resultados similares fueron observados por Yiannikouris y col., (2004) quienes ensayaron la capacidad de adsorción de ZEA por *S. cerevisiae* bajo diferentes pH (representativos al tracto GI) mostrando que en condiciones ácidas la adsorción de la micotoxina fue mayor (64 a 77%). Al igual que los resultados de esta tesis, el mecanismo de bioadsorción pudo verse afectado por condiciones ambientales. Este hecho refuerza la importancia de evaluar el efecto de las condiciones gastrointestinales sobre la capacidad de *S. cerevisiae* para adsorber diferentes micotoxinas. Estudios realizados por Hernández-Mendoza y col. (2009), informaron que las cepas de BAL cuando se sometían a la presencia de sales biliares, captaban mayor cantidad de AFB₁.

Este hallazgo podría tener un significado biológico importante, ya que estas cepas potencialmente probióticas estarán expuestas a pH ácido, a la presencia de sales biliares y a otras condiciones GI, lo que sugiere que las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas como aditivo alimentario con propiedades benéficas, pueden ser eficaces adsorbentes de diferentes micotoxinas, reduciendo su biodisponibilidad en el intestino del animal expuesto evitando así los efectos nocivos de las micotoxicosis en la producción animal.

Tabla 16. Porcentaje de adsorción de aflatoxina B₁ (%) por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* sometidas a condiciones gastrointestinales artificiales.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Adsorción de aflatoxina B ₁ 50 ng mL ⁻¹ (%) ± DS			
	CONTROL		TGI	
RC008	35,73 ± 3,73	ab	37,06 ± 13,96	b
RC009	46,06 ± 4,06	bc	24,74 ± 1,24	a
RC012	51,14 ± 4,56	c	47,07 ± 3,38	bc
RC016	36,11 ± 5,9	ab	41,83 ± 8,17f	bc

Control: células incubadas a 37 °C en PBS pH7.

TGI: células incubadas a condiciones gastrointestinales artificiales.

DS: desviación estándar

Letras distintas indican diferencias significativas LSD de Fisher (p<0,01).

Tabla 17. Porcentaje de adsorción de zearalenona (%) por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* sometidas a condiciones gastrointestinales artificiales.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Adsorción de zearalenona 10 µg mL ⁻¹ (%) ± DS			
	CONTROL		TGI	
RC008	17,77 ± 3,26	a	19,79 ± 4,29	a
RC009	42,36 ± 1,66	c	97,98 ± 1,48	e
RC012	17,74 ± 1,84	a	27,26 ± 5,14	b
RC016	43,87 ± 3,97	c	57,84 ± 3,84	d

Control: células incubadas a 37 °C en PBS pH7.

TGI: células incubadas a condiciones gastrointestinales artificiales.

DS: desviación estándar

Letras distintas indican diferencias significativas LSD de Fisher (p<0,01).

3. Determinación del tamaño de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* por estudios de microscopía electrónica.

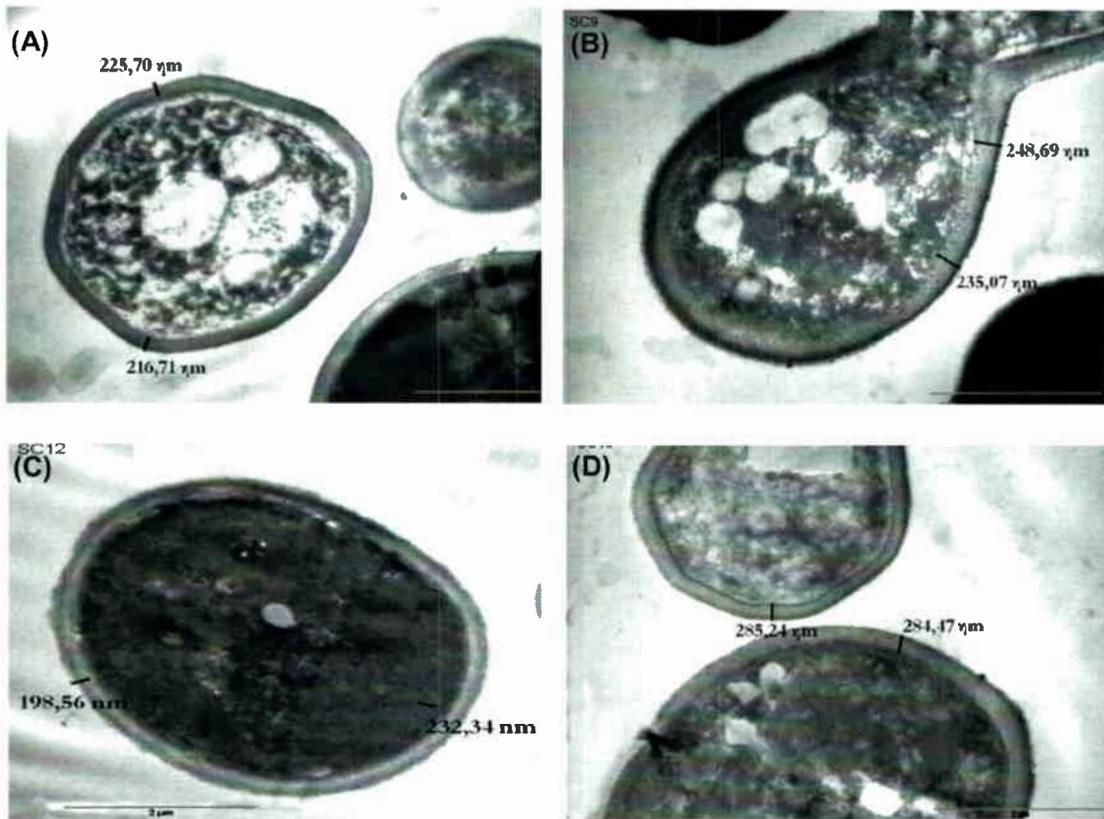


Figura 11: Microscopía electrónica de pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (A) RC008, (B) RC009, (C) RC012, (D) RC016. Los valores incorporados en la figura corresponden a los valores medios de pared celular de cada cepa estudiada (diámetro de célula n=330; espesor de pared celular n=250) (12000X).

Tabla 18. Relación entre el grosor de la pared celular/diámetro celular (μm) de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Espesor de pared celular/diámetro celular (μm) \pm DS	
RC008	0,08973920 \pm 0,02479619	c
RC009	0,10501329 \pm 0,02836057	ab
RC012	0,09506561 \pm 0,02555392	b
RC016	0,11170665 \pm 0,03306428	a

Número de observaciones para cada una de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* = 258
 DS: desviación estándar
 test LSD ($p \leq 0.0001$)

La Tabla 18 muestra la relación entre el grosor de la pared celular y el diámetro celular de las cepas de levaduras ensayadas. Las observaciones por microscopía electrónica revelan que el espesor de la pared varió significativamente entre las cepas RC016, RC012, RC008, obteniéndose un mayor espesor en la cepa RC016 (0,1117 μm) ($p \leq 0,0001$).

Estas diferencias que se observan en el grosor de la pared celular de las levaduras explicarían la diferencia en la captación de OTA y ZEA que se observan en las Tablas 15 y 17, respectivamente, ya que la cepa RC016 fue la que mostró mayor adsorción cuando las células de levaduras fueron incubadas con PBS y la toxina (control) y cuando fue expuesta a las condiciones GI. Esta relación también fue observada por Yiannikouris y col. (2004) quienes estudiaron la influencia de los componentes de la pared celular de *S. cerevisiae* en la eficacia de la adsorción de micotoxinas y por Caridi (2006) quienes explicaron las diferencias en la adsorción de OTA a través de la variabilidad estructural de las mananoproteínas de diferentes cepas de levaduras aisladas de vino.

La capacidad y el tipo de unión depende fuertemente de la estructura molecular de los componentes de la pared celular de la levadura y de la micotoxina a considerar (Yiannikouris y col, 2006). En este trabajo de tesis se observó una relación directa

entre la captación de OTA y ZEA y el grosor de la pared celular de la levadura. Si bien para AFB₁ no se observó esta relación, se deberían evaluar también otros procesos de descontaminación tales como la degradación o la acción a nivel de síntesis, además de la adsorción, en donde la pared celular cumpliría un rol adicional.

Las condiciones GI pueden producir modificaciones estructurales en la pared celular que permitan una mayor adsorción de micotoxinas (Cicoñová y col., 2010), por esto se deberían realizar estudios de medición de pared celular, por microscopía electrónica, luego de someter a las levaduras a las condiciones GI (presencia de sales biliares, pH ácido, etc). Si bien en este trabajo de tesis se postula que el mecanismo de remoción de micotoxinas es a través del proceso de adsorción, no se debe descartar la posibilidad de que existan, conjuntamente, otros mecanismos de descontaminación como la degradación de la toxina.

CONCLUSIONES PARCIALES

En esta sección se demuestra la eficacia de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas del ecosistema animal, de lograr la remoción de diferentes micotoxinas a diferentes concentraciones de la toxina y en condiciones del tracto gastrointestinal, propiedad fundamental para seleccionar un microorganismo benéfico que va a ser incorporado como aditivo alimentario, y se postula que esta capacidad de descontaminación está relacionada directamente con el espesor de la pared celular de las levaduras estudiadas.

Sección III

**Estudio ecofisiológico de hongos toxicogénicos en presencia
de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.**

INTRODUCCIÓN A LA SECCIÓN

Las materias primas para elaborar alimentos para animales son productos preparados industrialmente, cuya composición está representada por cereales (maíz, sorgo, trigo y harina de soya), subproductos de cereales, melaza de caña, grasa, calcio, fósforo, vitaminas, minerales trazas y aditivos (enzimas y hormonas). De estos componentes, los cereales, principalmente el maíz, el trigo, el sorgo y, recientemente, el arroz, son las principales fuentes energéticas que constituyen más del 50% del total de los ingredientes de las raciones para animales de producción (Covenin, 1983; González, 1990; Armas y Chicco, 2000).

La mayoría de los hongos filamentosos son contaminantes habituales de las materias primas de alimentos destinados al consumo animal, ya que son capaces de crecer en hojas, tallos, cereales y semillas, entre otros.

Dentro de los productos agrícolas, los más susceptibles a la contaminación por hongos son los cereales (arroz, trigo, cebada y maíz). El grado de contaminación de estos cereales depende de las condiciones climáticas a nivel de campo, de las condiciones de almacenamiento y procesamiento post-cosecha; estas condiciones están caracterizadas por temperaturas superiores a 30°C en las bodegas de almacenajes, la presencia de humedad interna del alimento por encima del 12%, la acción dañina de los insectos y otros microorganismos, que en conjunto favorecen la colonización de los hongos (Hashem, 1990; Hayes, 1993; Petersson y Schnürer, 1995; Gqaleni y col., 1997; Blanco, 1999; Colleen y David, 1999; Miller, 2001; Saunders, 2001; Scudamore, 2005; Cotty y García, 2007).

En diferentes investigaciones, se han aislado numerosas especies de hongos en muestras de alimentos concentrados destinados al consumo animal, estableciéndose que la mayoría de las especies aisladas pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Acremorium*, *Monilia*, *Botrytis*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Thichothecium*, *Absidia*, *Candida*, *Rhodotorula* y *Geotrichum*, entre otros (Kamphuis y col., 1992; Mahmoud, 1993; Dalceroy col., 1997; Magnoli y col., 1998; Pascual y Calderón, 2000; Dutta y Das, 2001; Amer, 2005; González Pereyra y col., 2008, 2009, 2011; Pena y col., 2009; Alonso y col., 2010; Pereyra y col., 2011 a, b).

Las micotoxinas que comúnmente contaminan los cereales son las aflatoxinas, ocratoxina A, deoxynivalenol y zearalenona, las cuales se caracterizan por su capacidad de resistir altas temperaturas; lo que trae como consecuencia que no sean

completamente destruidas durante el procesamiento del alimento, estando presente en el producto finalmente procesado (Bullerman y Bianchini, 2007).

Se han establecido reglamentos que limitan la concentración de micotoxinas en diversos países para proteger al consumidor de los efectos nocivos de estos compuestos. Estas regulaciones se establecen dependiendo de la disponibilidad de datos toxicológicos y de la aparición de nuevos datos, así como también, de un conocimiento detallado sobre las posibilidades de muestreo, análisis de las muestras y problemas socioeconómicos. A finales del año 2003, aproximadamente 100 países (que cubren el 85% de los habitantes del mundo) establecieron regulaciones específicas para las micotoxinas en los alimentos. Las normas se referían a las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, la aflatoxina M₁, los tricotecenos (deoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, T-2 y la toxina HT-2), Fumonisin (B₁, B₂ y B₃), ácido agárico, ocratoxina A, patulina, esterigmatocistina y zearalenona (Van Egmond y col., 2007). Las micotoxinas legisladas en alimentación humana en la Unión Europea son las AFs, la OTA, las Fumonisin (FBs), la ZEA, la Patulina (PAT) y el deoxinivalenol (DON). En los EE.UU. la Food and Drug Administration (FDA) ha regulado la presencia de tres grupos de micotoxinas en los alimentos: las AFs, el DON y las FBs.

En cuanto a Canadá, este país ha establecido niveles máximos admisibles para AFs en alimentos y piensos, y recomendaciones para DON y HT2. Por otra parte, ha señalado niveles de tolerancia recomendados para ZEA, OTA, T2 y diacetoxiscirpenol (DAS) (Charmley y Trenholm, 2011).

Los países del MERCOSUR adoptaron un Reglamento Técnico MERCOSUR sobre límites máximos de AFs admisibles en leche, maní (cacahuete) y maíz (Resolución 25/02 del Grupo Mercado Común de MERCOSUR) que los diferentes países han ido incorporando en sus legislaciones nacionales. Este Reglamento legisla las AFs totales (B₁+B₂+G₁+G₂) en maíz y cacahuete, así como la AFM₁ en leche fluida y leche en polvo. La Resolución 25/02 recoge también las referencias a los métodos de muestreo aplicables, y los métodos de análisis para leche, maíz y maní, así como los criterios de aceptación y rechazo del lote.

Las industrias procesadoras de alimentos concentrados para animales, deben garantizar que sus productos estén por debajo de los límites toxicológicos establecidos para micotoxinas. La mejor manera de evitar problemas de contaminación por micotoxinas, es a través de la prevención; sin embargo, muchas

veces las medidas de prevención son insuficientes, y se estima que gran parte de los granos del mundo se encuentren contaminados con micotoxinas. Por consiguiente, se han buscado diversas formas para tratar el grano contaminado (Nom, 2000). La mejor herramienta para evitar la presencia de micotoxinas en los alimentos es inspeccionar las condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad, actividad de agua); sin embargo, cuando la contaminación es inevitable, se deben utilizar estrategias de detoxificación teniendo en cuenta que el procedimiento ideal de descontaminación debe ser fácil de usar, de bajo costo y no debe producir compuestos que también sean tóxicos. Además el proceso no debe alterar el valor nutricional del grano o del alimento tratado (Martín y col., 2002).

Argentina es un país que se ha caracterizado a lo largo del tiempo por su importante producción agropecuaria. Sus sistemas de producción ganadera están basados en el pastoreo. Las características de su territorio, de grandes y fértiles extensiones han influido y potenciado el desarrollo de la actividad agrícola-ganadera, uno de los más importantes pilares sobre el que se asienta la economía argentina. La preservación de los alimentos por fermentación en silos es una de las estrategias más utilizadas en nuestro país. Este método de conservación de alimentos, basado en la fermentación con producción espontánea de ácido láctico bajo condiciones anaeróbicas, tiene por objeto minimizar la pérdida de nutrientes a partir de la cosecha durante el almacenamiento y mejorar la calidad de los piensos (Whitlow y Hagler, 2002; Beltzer, 2003; Seglar, 2004). Sin embargo, las malas condiciones de almacenamiento - incluyendo el exceso de humedad o sequedad, la condensación, calefacción, fugas de agua de lluvia e infestación de insectos - conduce a la proliferación de hongos toxicogénicos, esto conduce a la reducción de los valores nutricionales y a la producción de micotoxinas (Magan y Lacey, 1984). Los desequilibrios producidos por estos factores, se traducen en pérdidas de productividad en los sistemas ganaderos (Gallardo, 2007).

Muchas estrategias, incluyendo el control biológico, están siendo investigados para manejar, reducir y finalmente eliminar la contaminación de micotoxinas en los cultivos (Robens y Riley, 2002). El control biológico con agentes microbianos ofrece una alternativa ecológica al uso de pesticidas sintéticos (Janisiewicz y Korsten, 2002; Zhang y col., 2007).

El control de enfermedades de postcosecha mediante el uso de agentes biológicos ha sido ampliamente demostrado (Janisiewicz y Korsten, 2002; Bacon y col., 2001;

Duvick, 2001; Aysan y col., 2003; El-Ghaouth y col., 2003; Cavaglieri y col., 2004; Dahiya y col., 2005; Francés y col., 2006; Passone y col., 2007; Zhang y col., 2007). Se ha demostrado que cepas de levaduras aisladas de nueces, almendras y pistachos inhiben la producción de AFB₁ por *Aspergillus flavus in vitro* (Hua y col., 1999). Petersson y col., 1998 observaron que las levaduras *Pichia anomala* y *Saccharomyces cerevisiae* redujeron los niveles de la OTA, *in vitro*, de dos cepas de *Penicillium verrucosum*. Las levaduras pueden actuar como microorganismos antagonistas, disminuyendo considerablemente el crecimiento de hongos filamentosos, tanto *in vitro* como en las condiciones de almacenamiento (Wicklow y col., 1988, Petersson y Shürer 1995; Petersson y col., 1998) y tienen varias propiedades importantes a tener en cuenta para ser utilizadas con fines de control biológico: no producen esporas alergénicas, tienen generalmente simples requerimientos nutricionales y son capaces de colonizar las superficies secas por largos períodos de tiempo (Stringer, 1982; Bui y Galzy, 1990; Hussein y col., 1996).

El forraje de maíz almacenado como silo se somete a una amplia gama de condiciones ambientales diferentes. Las condiciones de temperatura, humedad, disponibilidad de oxígeno y pH varían durante el proceso de ensilado y la microbiota también puede cambiar de una etapa a otra. Varios autores han informado que las levaduras son microorganismos prevalentes en los ecosistemas de alimentación animal (González Pereyra y col. 2008, 2009, 2011, Pereyra y col. 2011 a,b). *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de crecer a baja a_w y a un amplio rango de pH y temperatura. Muchas de estas características sugieren que el microorganismo debe ser altamente competitivo en el ecosistema de almacenamiento de los alimentos. La competencia por los nutrientes desempeña un papel importante para la capacidad antifúngica.

Algunas de las especies pertenecientes al género *Aspergillus*, son importantes productores de micotoxinas, como las AFs, OTs, Glios, etc. Las especies de mayor importancia económica son *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Las especies *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, son productoras de AFs. Las especies como *A. ochraceus* y *Aspergillus* de la sección *Nigri* (grupo agregado *A. niger* y *A. carbonarius*) son reconocidas como potenciales productoras de OTA (Abarca y col., 2001). Especies de género *Fusarium*, como *F. graminearum* y *F. culmorum*, son productores de tricotecenos y ZEA.

No hay información disponible de la interacción entre *S. cerevisiae* y *A. parasiticus*, *A. carbonarius* y *F. graminearum*, y el impacto en la producción de sus micotoxinas en diferentes condiciones ambientales. Por lo tanto, es necesario dilucidar la efectividad de *S. cerevisiae* para controlar el crecimiento y la producción de AFB₁, ZEA y OTA en los diferentes condiciones de a_w , pH, temperatura y disponibilidad de oxígeno.

HIPÓTESIS

✓ Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas del ecosistema animal ejercen una acción inhibitoria hacia hongos micotoxicogénicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Determinar la capacidad de cepas de *S. cerevisiae* de disminuir la velocidad de crecimiento de *A. parasiticus*, productor de AFB₁; de *F. graminearum*, productor de ZEA y de *A. carbonarius*, productor de OTA.

✓ Determinar la capacidad de cepas de *S. cerevisiae* de aumentar la fase de latencia de *A. parasiticus*, productor de AFB₁; de *F. graminearum*, productor de ZEA y de *A. carbonarius*, productor de OTA.

✓ Determinar la capacidad de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de inhibir la producción de micotoxinas de cepas patrón de hongos productores de AFB₁, ZEA y OTA.

✓ Corroborar la designación de especie de cepas patrón de hongos toxicogénicos, a través de la identificación morfológica de las mismas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Identificación morfológica de hongos toxicogénicos

1.1. Medios y soluciones.

Los medios y soluciones para la identificación de especies de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* se detallan en el Anexo.

1.2. Identificación de las especies del género *Aspergillus*

Todas las especies de este género tienen una característica taxonómica en común: la disposición de conidios en cabezas aspergilaras monoseriadas o biseriadas y presencia de célula pie en el origen del conidióforo (Figura 12). Estas características estables, combinadas con otras primarias y secundarias constituyen la base para la taxonomía clásica del género *Aspergillus*.

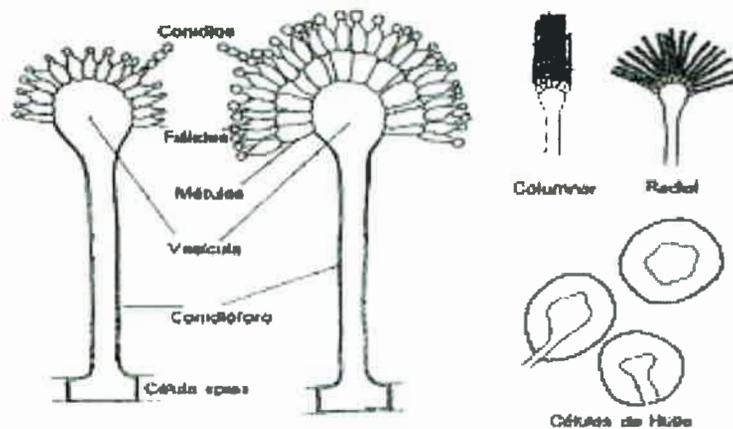


Figura 12: Características de los conidióforos de *Aspergillus*.

Los criterios diagnósticos utilizados para clasificar a las secciones y especies de *Aspergillus* se basan en las características macroscópicas y microscópicas de las colonias desarrolladas en los medios de cultivo agar extracto de malta (MEA), agar Czapek extracto de levadura (CYA), agar nitrato glicerol al 25% (G25N) y agar Czapek extracto de levadura sacarosa al 20% (CY20S).

Las descripciones macroscópicas se basan en los siguientes aspectos:

- ✓ Diámetro, textura y reverso de las colonias.
- ✓ Color de los conidios y del micelio.
- ✓ Producción de pigmentos.
- ✓ Producción de esclerocios, y/o cleistotecios.

Las características microscópicas son:

- ✓ Forma, color y tamaño de la cabeza aspergilar.
- ✓ Forma y tamaño de la vesícula.
- ✓ Longitud del estipite.
- ✓ Presencia de fálides y/o métulas y disposición sobre la cabeza aspergilar.
- ✓ Diámetro, textura y tamaño de los conidios.
- ✓ Forma y tamaño de los esclerocios, ascos y ascosporas, presencia o ausencia de células de Hülle.

1.2.1. Desarrollo experimental

Se realizará a partir de cada cepa de *Aspergillus sp.* una suspensión de esporas en agar soft; y desde aquí se inocularán los medios de cultivo CYA, MEA, G25N y CY20S, en tres puntos equidistantes entre sí, del borde y del centro de la placa, siguiendo el esquema de inoculación que se muestra en la Figura 13. Los medios se incubarán durante 7 días a 28 y 37 ± 1°C según corresponda. La identificación se realizará siguiendo las claves taxonómicas de Klich y Pitt (1988).

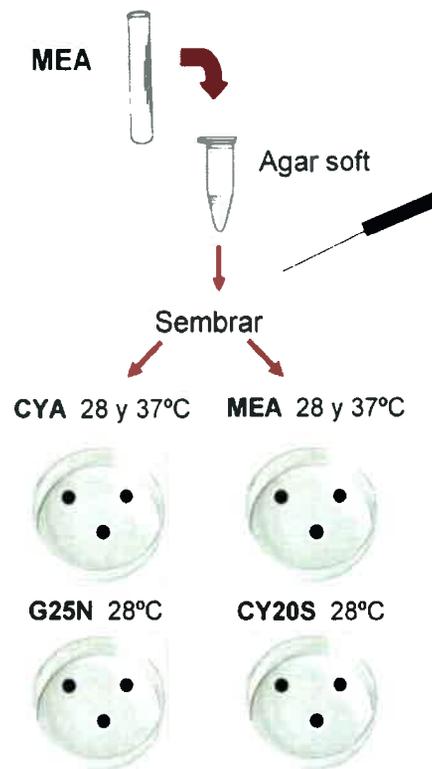


Figura 13: Esquema de inoculación para la identificación de especies del género *Aspergillus*.

1.3. Identificación de las especies del género *Fusarium*

La mayoría de las especies de *Fusarium* son hongos del suelo y su distribución es muy amplia. Son parásitos de plantas y causan podredumbre en raíz, tallos y frutos. Algunas son patógenas para el hombre y animales. Otras causan podredumbre en el almacenamiento y otras son productoras de micotoxinas. La identificación de las especies es difícil debido a la variabilidad de las cepas y a las mutaciones que pueden ocurrir en los cultivos por repiques continuos. A fin de evitar las mutaciones es importante iniciar los cultivos a partir de cultivos monospóricos.

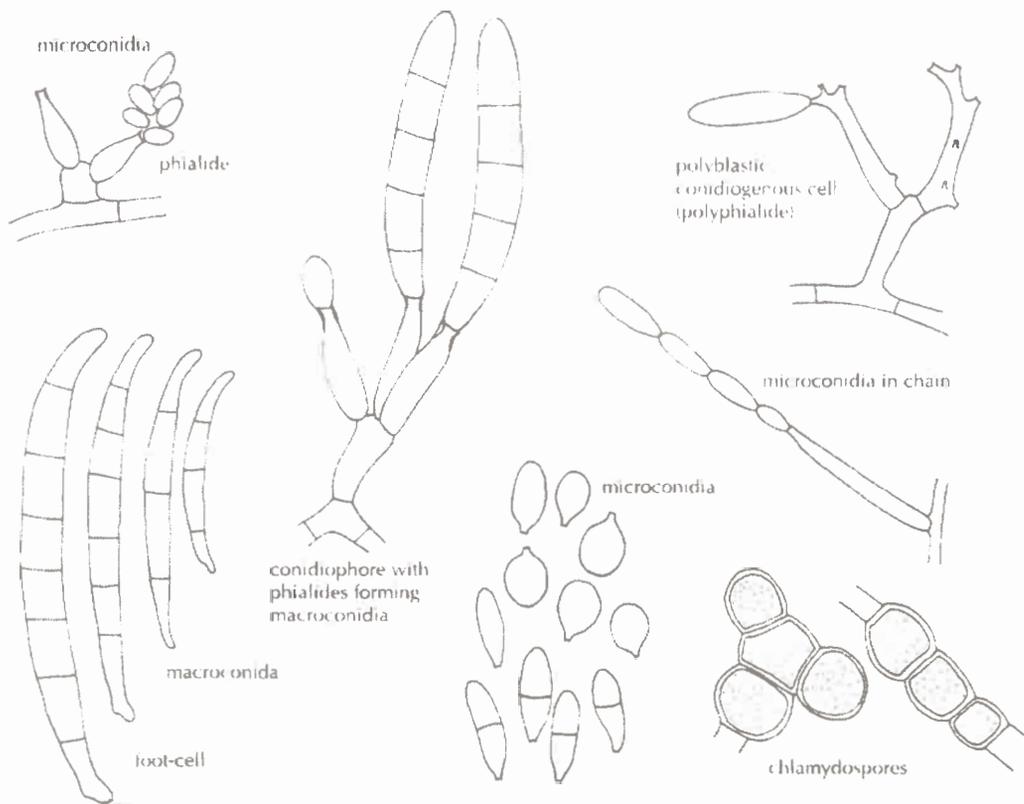


Figura 14: Características de los conidióforos de *Fusarium*.

1.3.1. Características a considerar para realizar la identificación

Colonias: en general las colonias son de crecimiento rápido, el micelio de color blanco, amarillo, rosa, violeta.

Conidióforos: generalmente ramificados y en algunas especies reducidos a una sola fiálide formando a veces un complejo de pústulas (esporodoquios) o formando una masa mucosa de esporas con aspecto oleoso (pionotes).

Fiálides: a menudo delgadas y aguzadas con una o varias aberturas fértiles (mono o polifiálides).

Conidios: de dos tipos, macroconidios con uno a varios septos, en forma de hoz o fusiformes, la mayoría con una célula apical alargada y una célula basal pedicelada.

Los microconidios generalmente unicelulares más pequeños que los macroconidios, piriformes, fusiformes, ovoides, rectos o curvados. Algunas especies presentan las dos formas.

Clamidosporas: a veces presentes en forma intercalar, solitarias, en cadenas, en racimos, formadas en las hifas o conidios.

Esclerocios: presentes o ausentes.

Otros caracteres, tales como la morfología de la colonia, la pigmentación y la velocidad de crecimiento pueden ser de utilidad en la clasificación si se basan en procedimientos estandarizados.

Para la **identificación** se utilizan los medios: agar hojas de clavel (CLA) y agar papa glucosado (APG). Las características microscópicas se definen con el crecimiento en CLA, ya que, este medio favorece la esporulación sobre el desarrollo miceliano, con producción de conidios y conidióforos en abundancia, uniformes en tamaño y forma; reduciendo así la variación fenotípica; y las características culturales se definen con el crecimiento en APG.



Figura 15. Esquema de inoculación para la identificación de las especies del género *Fusarium*.

1.3.2. Desarrollo experimental

Se realizará un cultivo monospórico de cada cepa a identificar por el método estándar de dilución en placa. Se preparará una suspensión conidial de cada cepa de *Fusarium* en agua destilada estéril, se transferirá sobre agar agua (AA) al 1,5% en placas de Petri, y se incubará a temperatura ambiente durante 16 h. Los conidios germinados se transfieren a los medios de cultivo CLA en placas de Petri de 6 mm y en tubos de ensayo con APG (Figura 15). Los cultivos se incubarán durante dos semanas a temperatura ambiente, con ciclos alternativos de luz blanca y luz negra de 12/12 h a 25°C. La identificación de las cepas se realizará siguiendo la metodología propuesta por Nelson y col. (1983).

2. Efecto de la interacción de *Saccharomyces cerevisiae* en el crecimiento y producción de micotoxinas de *Aspergillus parasiticus*, *A. carbonarius* y *Fusarium graminearum*

2.1. Microorganismos

Se utilizaron las cepas *Saccharomyces cerevisiae* RC008 y RC016, las cuales fueron mantenidas a -80°C en glicerol al 30% (v / v).

Se utilizaron las cepas patrones *A. parasiticus* NRRL2999 (productor de AFB₁), *A. carbonarius* (productor de OTA) y *F. graminearum* Z3636 (productor de ZEA) que fueron obtenidas del cepario de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

2.2. Diseño del medio de cultivo

El medio básico que se utilizó en este estudio fue agar ensilado (que contiene 40 g de extracto de ensilado y 20 g de agar en 1 L de agua destilada). La actividad de agua se ajustó a 0,95 y 0,99 por la adición de cantidades conocidas de la glicerina de solutos no iónicos (Marín y col., 1998). El medio básico con diferentes niveles de a_w se ajustó a pH 4 y pH 6 añadiendo la cantidad necesaria de HCl y NaOH. El medio fue esterilizado en autoclave durante 20 min a 121°C.

2.3. Preparación del inóculo

2.3.1. Inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*

Cada cepa de levadura fue sembrada en caldo YPD e incubadas durante 24 h a 37°C. Después de la incubación, se recogieron las células por centrifugación (5000 rpm 10 min), Se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS pH 7,2) y una vez con agua estéril bidestilada. Finalmente, los pellets de levadura (1×10^7 células mL⁻¹) se suspendieron en PBS estéril antes de usar en los ensayos.

2.3.2. Inóculo de hongos toxicogénicos

Las tres cepas de hongos fueron sembradas en MEA durante 5 días a 25°C para obtener una gran esporulación.

2.4. Estudios de tasa de crecimiento y fase de latencia

Los estudios de crecimiento se analizaron como describe Nesci y col. (2003) con algunas modificaciones. Un mililitro (1 mL) de las cepas de *S. cerevisiae* RC008 y RC016 (1×10^7 UFC mL⁻¹) se sembraron en placas de agar ensilaje a diferentes valores de pH y a_w . Después de la solidificación, las placas fueron inoculadas en el centro con esporas de cada uno de los hongos, en suspensión en agar semisólido. Las placas de Petri con valores de iguales a_w fueron selladas en bolsas de polietileno. Las placas se incubaron a 25°C o 37°C bajo condiciones de presión normal y reducida de oxígeno (microaerofilia). El radio de la colonia se midió cada 24 h y se comparó con el control (cada hongo toxicogénico se sembró en placas con medio ensilaje-agar sin levadura a cada condición). Para cada colonia, dos radios, medidos en ángulo recto uno de otro, se promediaron para encontrar la media de los radios para cada colonia. Todos los radios se determinaron usando 3 réplicas de cada interacción. La velocidad de crecimiento radial (mm h⁻¹) se calculó posteriormente por regresión lineal de crecimiento. El tiempo en que la línea interceptó el eje X se utilizó para calcular la fase de latencia en relación con la cepa de levadura, la actividad del agua, la temperatura y la presión de oxígeno (Figura 16). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Después de evaluar el crecimiento, todas las muestras fueron congeladas para la posterior extracción y cuantificación de micotoxina.

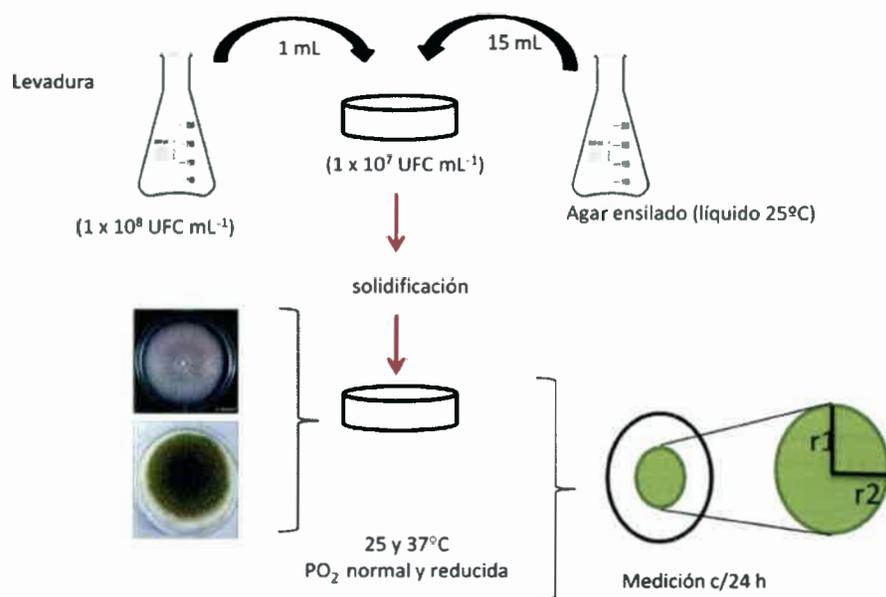


Figura 16. Esquema de siembra para estudio de tasa de crecimiento y fase de latencia.

2.5. Producción de micotoxinas

Se tomó todo el medio de cultivo de cada placa de todos los tratamientos, se transfirieron a un matraz Erlenmeyer con 20 mL de cloroformo. La mezcla se agitó durante 30 min a 200 rpm. El extracto cloroformico se secó con gas nitrógeno. El residuo se disolvió de nuevo en 1 mL de cloroformo para la cuantificación de AFB₁, ZEA y OTA por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), siguiendo las metodologías de detección propuestas por Trucksess y col. (1994), Cerveró y col. (2007) y Scudamore y McDonald (1998), respectivamente.

2.6. Análisis estadísticos

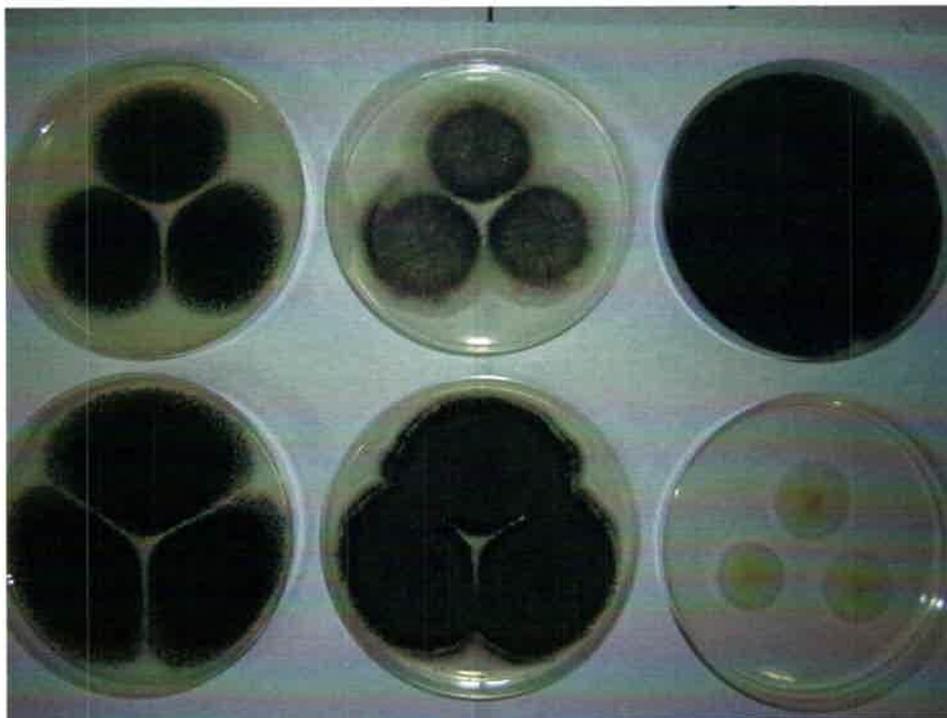
La determinación de la influencia de *S. cerevisiae* RC008 y RC016 sobre el crecimiento de *A. parasiticus*, *A. carbonarius* y *F. graminearum* y sobre la producción de aflatoxina B₁ de *A. parasiticus* fueron analizados por el análisis de la varianza (ANOVA). Las medias obtenidas a partir del estudio de crecimiento y la producción de micotoxinas se compararon mediante el test LSD protegido de Fisher (Quinn y col., 2002). El análisis se realizó utilizando PROC GLM de SAS (SAS Institute, Cary, NC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Identificación de hongos micotoxicogénicos

Los resultados obtenidos corroboran la identidad de las cepas *A. parasiticus*, *A. carbonarius* y *F. graminearum* utilizadas en este trabajo (Fig. 17 y 18).

(A)



(B)



Figura 17. Características macroscópicas de (A) *A. carbonarius* y (B) *A. parasiticus*.

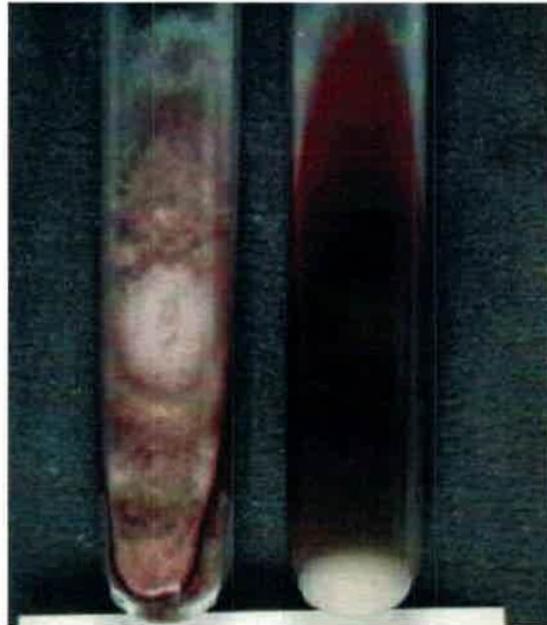


Figura 18. *Fusarium graminearum* en tubos con Agar Papa Glucosado

2. Efecto de la interacción de *Saccharomyces cerevisiae* en el crecimiento de hongos

2.1. Efecto de la interacción de *Saccharomyces cerevisiae* en la velocidad de crecimiento de *Aspergillus parasiticus*

El análisis estadístico del efecto de las cepas de levaduras (C), pH, temperatura (T°) disponibilidad de oxígeno (P°O₂), actividad acuosa (a_w) sobre la velocidad de crecimiento de *A. parasiticus* mostró que la influencia de C, pH, P°O₂, a_w y la interacción de todos los factores fueron estadísticamente significativos. Mientras que la temperatura no ejerció una influencia diferencia significativa sobre la velocidad de crecimiento del hongo (P<0,0001) (Tabla 19).

En general, *A. parasiticus* sin interactuar con las levaduras, muestra el mayor crecimiento a pH 6 en ambas T° analizadas, excepto a P°O₂ reducido, donde el crecimiento se inhibió completamente (Tabla 20). No hubo diferencias en la tasa de crecimiento de *A. parasiticus* a pH 4 bajo la influencia de todas las condiciones de temperatura, presión de oxígeno y actividad acuosa. En el estudio del efecto de las cepas de *S. cerevisiae* se observa que ambas cepas de levaduras fueron capaces de reducir significativamente la tasa de crecimiento de *A. parasiticus* en todos los factores que interactuaron (P <0,05). Al comparar los dos cepas de levaduras, *S. cerevisiae* RC008 fue más eficiente que *S. cerevisiae* RC016 para reducir la tasa de crecimiento de *A. parasiticus*.

Tabla 19. Significancia estadística de los factores cepas (C), pH, temperatura (T°) disponibilidad de oxígeno (P°O₂), actividad de agua (a_w) y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento de *Aspergillus parasiticus*.

Factores	gl	CM	F	Pr (>F)
C	2	0,75	491,13	<0,0001
pH	1	0,03	78,65	<0,0001
T°	1	5,1 x 10 ⁻⁴	0,33	0,5672
P°O ₂	1	0,09	56,68	<0,0001
a _w	1	0,03	19,95	<0,0001
C:pH:T°:P°O ₂ :a _w	33	0,12	19,94	<0,0001

gl: grados de libertad, CM: cuadrado medio F: valor de F-Snedecor

Tabla 20. Efecto de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la velocidad de crecimiento de *Aspergillus parasiticus* bajo diferentes condiciones de pH, temperatura (T°), disponibilidad de oxígeno (P°O₂) y actividad de agua (a_w).

Condiciones de crecimiento				Velocidad de crecimiento (mm h ⁻¹)						
pH	T°	P°O ₂	a _w	Control ¹		Interacción 1 ²		Interacción 2 ³		
				Media ± DS		Media ± DS		Media ± DS		
4	25	normal	0,99	0,30 ± 0,01	defg	0,02 ± 0,01	r	0,23 ± 0,015	ijkl	
			0,95	0,36 ± 0,005	cde	0,02 ± 0,01	r	0,23 ± 0,006	ijkl	
		reducido	0,99	0,34 ± 0,005	def	0,05 ± 0,005	qr	0,27 ± 0,006	ghij	
			0,95	0,36 ± 0,005	cde	0,11 ± 0,01	opq	0,17 ± 0,005	lmno	
	37	normal	0,99	0,39 ± 0,06	cde	0,14 ± 0,06	klmn	0,16 ± 0,035	mno	
			0,95	0,35 ± 0,006	def	0,21 ± 0,01	jklmn	0,22 ± 0,02	jkl	
		reducido	0,99	0,35 ± 0,005	def	0,17 ± 0,005	lmno	0,16 ± 0,015	mno	
			0,95	0,35 ± 0,015	def	0,14 ± 0,1	no	0,04 ± 0,04	r	
	6	25	normal	0,99	0,39 ± 0,065	cd	0,12 ± 0,006	op	0,37 ± 0,006	cde
				0,95	0,55 ± 0,15	ab	0,15 ± 0,005	no	0,06 ± 0,05	pqr
			reducido	0,99	0,52 ± 0,006	b	0,12 ± 0,006	op	0,42 ± 0,05	c
				0,95	0,38 ± 0,006	dce	0,16 ± 0,015	mno	0,14 ± 0,01	no
37		normal	0,99	0,52 ± 0,006	b	0,13 ± 0,02	o	0,32 ± 0,01	efgh	
			0,95	0,61 ± 0,006	a	0,26 ± 0,005	hij	0,29 ± 0,015	fghi	
		reducido	0,99	0,34 ± 0,025	def	0,2 ± 0,01	klmn	0,15 ± 0,03	mno	
			0,95	0,01 ± 0,005	r	0,13 ± 0,07	o	0,26 ± 0,015	hij	

¹ control: *Aspergillus parasiticus* sin levadura, ² interacción 1: *Aspergillus parasiticus* - *Saccharomyces cerevisiae* RC008, ³ interacción 2: *Aspergillus parasiticus* - *Saccharomyces cerevisiae* RC016. Letras distintas indican diferencias significativas (p <= 0,05).

2.2. Efecto de *Saccharomyces cerevisiae* en la fase de latencia de *Aspergillus parasiticus*

El análisis estadístico de las cepas de levadura (C), pH, temperatura (T°), disponibilidad de oxígeno (P°O₂), actividad de agua (a_w) sobre la fase de latencia mostró que todas las condiciones estudiadas, individuales y en conjunto, fueron estadísticamente significativas (Tabla 21).

La Tabla 22 muestra el efecto de las cepas de *S. cerevisiae* sobre la fase de latencia de *A. parasiticus* bajo la interacción de diferentes condiciones ambientales. En general, *S. cerevisiae* RC016 no fue capaz de aumentar la fase de latencia a niveles significativos (p <0,05). A pH 6 y en la menor actividad de agua probada (0.95) la fase de latencia fue mayor (96,17; 98,32; 127,33; 144,50 h). A pH 4, *S. cerevisiae* RC008 fue más eficiente para aumentar la fase de latencia (p <0,05).

Tabla 21. Significancia estadística de los factores cepas (C), pH, temperatura (T°) disponibilidad de oxígeno (P°O₂), actividad de agua (a_w) y sus interacciones sobre la fase latencia de *Aspergillus parasiticus*.

Factores	gl	CM	F	Pr (>F)
C	2	6489,46	10,32	0,0001
pH	1	21863,38	34,78	<0,0001
T°	1	161,16	87,74	<0,0001
P°O ₂	1	1621,52	8,85	0,0001
a _w	1	55148,94	1,53	0,0001
C:pH:T°:P°O ₂ :a _w	33	2078,27	14,36	<0,0001

gl: grados de libertad, CM: cuadrado medio F: valor de F-Snedecor

Tabla 22. Efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la fase de latencia de *Aspergillus parasiticus* en interacción con diferentes condiciones de pH, temperatura (T°), disponibilidad de oxígeno (P°O₂) y actividad de agua (a_w).

Condiciones de crecimiento				Fase de latencia (h)						
pH	T°	P°O ₂	a _w	Control ¹		Interacción 1 ²		Interacción 2 ³		
				Media ± DS		Media ± DS		Media ± DS		
4	25	normal	0,99	16,45 ± 2,08	mnop	9,50 ± 0,50	nop	54,79 ± 9,79	ghijkl	
			0,95	34,76 ± 1,33	klmno	80,38 ± 13,62	cdefg	44,88 ± 5,32	hijklm	
		reducido	0,99	9,51 ± 2,54	nop	85,10 ± 5,90	cdef	22,96 ± 1,48	lmnop	
			0,95	33,78 ± 1,49	klmno	55,67 ± 33,16	fghij	48,21 ± 24,14	hijklm	
	37	normal	0,99	22,57 ± 7,42	mnop	80,66 ± 27,34	cdefg	36,47 ± 10,63	klmno	
			0,95	25,56 ± 2,14	klmnop	43,3 ± 16,45	ijklm	25,31 ± 0,65	klmnop	
		reducido	0,99	22,30 ± 0,83	mnop	40,48 ± 3,63	jklmn	29,47 ± 0,53	klmnop	
			0,95	28,41 ± 3,26	klmnop	103,19 ± 55,06	bcde	81,23 ± 0,025	cdefg	
	6	25	normal	0,99	32,93 ± 19,64	klmnop	48,22 ± 12,86	ghijklm	41,30 ± 0,70	ijklm
				0,95	96,17 ± 17,41	bcde	109,62 ± 54,29	bc	96,80 ± 0,20	bcde
			reducido	0,99	36,84 ± 0,01	klmno	31,23 ± 0,02	klmnop	40,89 ± 13,36	jklmn
				0,95	98,32 ± 0,42	bcde	109,99 ± 0,70	bc	86,87 ± 13,80	cdef
37		normal	0,99	34,45 ± 0,16	klmno	37,82 ± 4,185	klmn	43,34 ± 16,37	ijklm	
			0,95	127,73 ± 0,27	ab	71,72 ± 6,35	efghij	75,28 ± 0,26	defgh	
		reducido	0,99	18,33 ± 9,19	mnop	74,52 ± 3,98	defghi	10,88 ± 7,12	nop	
			0,95	144,50 ± 0,50	a	136,30 ± 37,70	ab	132,25 ± 0,25	ab	

¹ control: *Aspergillus parasiticus* sin levadura, ² interacción 1: *Aspergillus parasiticus* - *Saccharomyces cerevisiae* RC008, ³ interacción 2: *Aspergillus parasiticus* - *Saccharomyces cerevisiae* RC016. Letras distintas indican diferencias significativas (p ≤ 0,05).

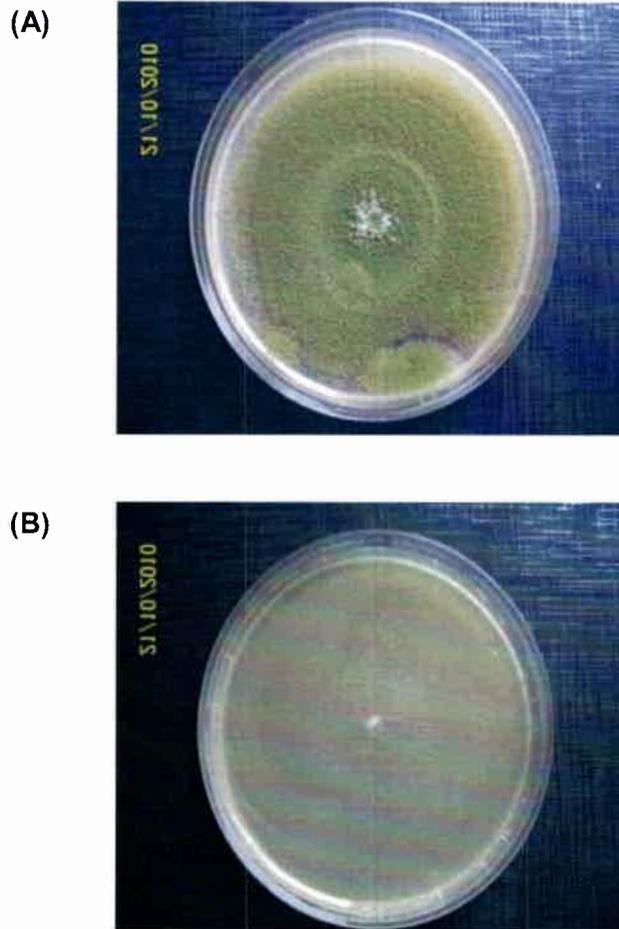


Figura 19. Efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre el crecimiento de *Aspergillus parasiticus*. **(A):** *Aspergillus parasiticus* (control). **(B):** *Aspergillus parasiticus* en interacción con *Saccharomyces cerevisiae* RC008 (interacción 2). Medio agar ensilaje pH 4, a_w 0,99, luego de 120 hs de incubación a 37°C.

2.3. Efecto de la interacción de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la velocidad de crecimiento de *Aspergillus carbonarius*.

El análisis estadístico del efecto de las cepas de levaduras (C), pH, temperatura (T°) disponibilidad de oxígeno (P°O₂), actividad acuosa (a_w) sobre la velocidad de crecimiento de *A. carbonarius* mostró que C, T°, P°O₂ and a_w fueron estadísticamente significativos. Mientras que el pH no ejerció una influencia significativa sobre la velocidad de crecimiento del hongo (P <0,001) (Tabla 23).

En general, *A. carbonarius* sin interactuar con las levaduras, mostró el mayor crecimiento a pH 4 y a 25°C (Tabla 24). En general no hubo diferencias en la tasa de crecimiento de *A. carbonarius* a 37°C en todas las condiciones de pH, exceptuando los tratamientos en condiciones de microaerofilia (P°O₂ reducida) en donde el hongo no creció. En el estudio del efecto de las cepas de *S. cerevisiae* se observó que ambas cepas de levaduras fueron capaces de reducir significativamente la tasa de crecimiento de *A. carbonarius* a pH 6 en todas las condiciones que interactuaron (P <0,05) aunque no se observó una diferencia significativa en la reducción de la velocidad del hongo a 37°C, P°O₂ normal y a_w=0,95. A pH 4, 37°C, P°O₂ normal, en ambas actividades de agua ensayadas, las levaduras efectuaron una disminución significativa en el crecimiento de *A. carbonarius*. Al comparar las dos cepas de levaduras, *S. cerevisiae* RC008 fue más eficiente en reducir la tasa de crecimiento de *A. carbonarius* a pH 4, mientras que a pH 6 resultó ser más eficiente *S. cerevisiae* RC016.

Tabla 23. Significancia estadística de cepas (C), pH, temperatura (T°) disponibilidad de oxígeno (P°O₂), actividad de agua (a_w) y sus interacciones con velocidad de crecimiento de *Aspergillus carbonarius*.

Factores	gl	CM	F	Pr (>F)
C	2	0,15	190,26	<0,0001
pH	1	0,01	7,64	0,0068
T°	1	1,59	2052,04	<0,0001
P°O ₂	1	0,04	53,85	<0,0001
a _w	1	0,0031	3,95	0,0497
C:pH:T°:P°O ₂ :a _w	41	0,37	11,57	<0,0001

gl: grados de libertad, CM: cuadrado medio F: valor de F-Snedecor

Tabla 24. Efecto de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la velocidad de crecimiento de *Aspergillus carbonarius* bajo diferentes condiciones de pH, temperatura (T°), disponibilidad de oxígeno (P°O₂) y actividad de agua (a_w).

Condiciones de crecimiento				Velocidad de crecimiento (mm h ⁻¹)					
pH	T°	P°O ₂	a _w	Control ¹		Interacción 1 ²		Interacción 2 ³	
				Media ± DS		Media ± DS		Media ± DS	
4	37	normal	0,99	0,09 ± 0,02	def	0 ± 0	a	0,03 ± 0	abc
			0,95	0,16 ± 0,005	gh	0,05 ± 0,015	abcd	0,03 ± 0,005	ab
		reducido	0,99	0,05 ± 0,005	abcd	0 ± 0	a	0,06 ± 0,02	bcde
			0,95	0 ± 0	a	0 ± 0	a	0 ± 0	a
	25	normal	0,99	0,44 ± 0,015	p	0,24 ± 0,105	ijklm	0,21 ± 0,03	ijk
			0,95	0,28 ± 0,01	mno	0,27 ± 0,025	lmno	0,25 ± 0,045	klm
		reducido	0,99	0,43 ± 0,01	p	0,17 ± 0	ghi	0,13 ± 0,055	fg
			0,95	0,26 ± 0,015	klmn	0,20 ± 0,015	hij	0,23 ± 0,005	jkl
6	37	normal	0,99	0,11 ± 0,025	ef	0 ± 0	a	0 ± 0	a
			0,95	0,07 ± 0,005	bcde	0,04 ± 0,025	abc	0,03 ± 0,005	ab
		reducido	0,99	0 ± 0	a	0 ± 0	a	0 ± 0	a
			0,95	0,09 ± 0,01	def	0,06 ± 0,01	bcde	0,01 ± 0	a
	25	normal	0,99	0,4 ± 0,02	p	0,30 ± 0,005	no	0,08 ± 0,005	cde
			0,95	0,31 ± 0,105	o	0,24 ± 0,01	ijklm	0,22 ± 0,025	ijk
		reducido	0,99	0,28 ± 0,015	mno	0,22 ± 0,015	ijk	0,06 ± 0,01	bcde
			0,95	0,31 ± 0,05	o	0,22 ± 0,005	ijk	0,22 ± 0,03	jkl

¹ control: *Aspergillus carbonarius* sin levadura, ² interacción 1: *Aspergillus carbonarius*- *Saccharomyces cerevisiae* RC008, ³ interacción 2: *Aspergillus carbonarius* - *Saccharomyces cerevisiae* RC016. Letras distintas indican diferencias significativas (p ≤ 0,05).

2.4. Efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la fase de latencia de *Aspergillus carbonarius*.

El análisis estadístico de los factores cepas de levadura (C), pH, temperatura (T°), disponibilidad de oxígeno (P°O₂), actividad de agua (a_w) sobre la fase de latencia mostró que todas las condiciones estudiadas fueron estadísticamente significativas (Tabla 25) (p <0,0001).

La Tabla 26 muestra el efecto de las cepas de *S. cerevisiae* sobre la fase de latencia de *A. carbonarius* bajo la interacción de diferentes condiciones ambientales. En general, *S. cerevisiae* RC008 no fue capaz de aumentar la fase de latencia a niveles significativos (p <0,05), solo en el 31,3 % de los tratamientos probados, *S. cerevisiae* RC016 resultó ser más eficiente para aumentar la fase de latencia, en el 56,3% de los tratamientos ensayados (p <0,05).

Tabla 25. Significancia estadística de los factores cepas (C), pH, temperatura (T°) disponibilidad de oxígeno (P°O₂), actividad de agua (a_w) y sus interacciones sobre fase latencia de *Aspergillus carbonarius*.

Factores	gl	CM	F	Pr (>F)
C	2	15904,08	70,25	<0,0001
pH	1	20795,32	91,86	<0,0001
T°	1	451816,99	1995,86	<0,0001
P°O ₂	1	16570,55	73,20	<0,0001
a _w	1	61888,59	273,39	<0,0001
C:pH:T°:P°O ₂ :a _w	41	6488,86	28,66	<0,0001

gl: grados de libertad, CM: cuadrado medio F: valor de F-Snedecor

Tabla 26. Efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la fase latencia de *Aspergillus carbonarius* en interacción con diferentes condiciones de pH, temperatura (T°), disponibilidad de oxígeno (P°O₂) y actividad de agua (a_w).

Condiciones de crecimiento				Fase de latencia (h)					
pH	T°	P°O ₂	a _w	Control ¹		Interacción 1 ²		Interacción 2 ³	
				Media ± DS		Media ± DS		Media ± DS	
4	37	normal	0,99	131,20 ± 1,66	cd	215±0	a	208,67 ± 25	a
			0,95	72,06 ± 21,06	ef	32,83 ± 0,5	kmnopqr	183,75 ± 21,75	b
		reducido	0,99	152,50 ± 7,5	c	215 ± 0	a	213,75 ± 35,25	a
			0,95	215 ± 0	a	215 ± 0	a	215 ± 0	a
	25	normal	0,99	29,37 ± 3,21	lmnopqr	41,46 ± 28,62	ijklmnop	55,64 ± 7,53	efghijk
			0,95	50,83 ± 3,65	fghijklm	34,59 ± 2,305	kmnopqr	51,84 ± 9,885	efghijkl
		reducido	0,99	27,84 ± 2,455	lmnopqr	34,56 ± 4,56	kmnopqr	69,91 ± 7,955	efg
			0,95	48,47 ± 5,425	fghijklmn	18,46 ± 1,785	pqr	59,70 ± 4,305	efghij
6	37	normal	0,99	136,25 ± 16,25	c	215 ± 0	a	215 ± 0	a
			0,95	16,35 ± 11,515	qr	75,42 ± 46,585	e	65,59 ± 36,915	efghi
		reducido	0,99	215 ± 0	a	215 ± 0	a	215 ± 0	a
			0,95	25,57 ± 4,935	nopqr	108,93 ± 16,07	d	75,50 ± 41,5	e
	25	normal	0,99	23,83 ± 2,36	opqr	37,33 ± 2,325	jklmnopq	31,29 ± 14,58	kmnopqr
			0,95	43,15 ± 9,65	hijklmno	34,36 ± 0,445	kmnopqr	45,76 ± 10,495	ghijklmno
		reducido	0,99	10,53 ± 2,065	r	15,27 ± 9,515	qr	67,50 ± 2,5	efgh
			0,95	42,46 ± 5,04	ijklmnop	26,92 ± 2,63	mnopqr	48,96 ± 9,46	fghijklmn

¹ control: *Aspergillus carbonarius* sin levadura, ² interacción 1: *Aspergillus carbonarius* - *Saccharomyces cerevisiae* RC008, ³ interacción 2: *Aspergillus carbonarius*- *Saccharomyces cerevisiae* RC016. Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

2.5. Efecto de la interacción de *Saccharomyces cerevisiae* sobre el crecimiento de *Fusarium graminearum*.

El análisis estadístico del efecto de cepas de levaduras (C), pH, temperatura (T°) disponibilidad de oxígeno (P°O₂), actividad acuosa (a_w) sobre la velocidad de crecimiento de *F. graminearum* mostró que C, T° y a_w fueron estadísticamente significativos. Mientras que el pH y la P°O₂ no ejerció una influencia significativa en la velocidad de crecimiento del hongo (p <0,0001) (Tabla 27).

En general, *F. graminearum* sin interactuar con las levaduras, no creció a 37°C en todas las condiciones de pH, P°O₂ y a_w estudiadas (Tabla 28). En el estudio del efecto de las cepas de *S. cerevisiae* se observó que *S. cerevisiae* RC0016 inhibió completamente el crecimiento del hongo en todos los ensayos de interacción probados en este informe (p <0,05). *Saccharomyces cerevisiae* RC008, logró disminuir significativamente la velocidad de crecimiento de *F. graminearum* a pH4 y 25°C, mientras que a pH6 la reducción en la velocidad de crecimiento producida por la levadura, no fue estadísticamente significativa.

Tabla 27. Significancia estadística de los factores cepas (C), pH, temperatura (T°) disponibilidad de oxígeno (P°O₂), actividad de agua (a_w) y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento de *Fusarium graminearum*.

Factores	gl	CM	F	Pr (>F)
C	2	0,12	34,07	<0,0001
pH	1	0,01	3,16	0,0784
T°	1	0,47	128,48	<0,0001
P°O ₂	1	0,0001	0,03	0,8689
a _w	1	0,12	34,02	<0,0001
C:pH:T°:P°O ₂ :a _w	41	0,02	5,57	<0,0001

gl: grados de libertad, CM: cuadrado medio F: valor de F-Snedecor.

Tabla 28. Efecto de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la velocidad de crecimiento de *Fusarium graminearum* bajo diferentes condiciones de pH, temperatura (T°), disponibilidad de oxígeno (P°O₂) y actividad de agua (a_w).

Condiciones de crecimiento				Velocidad de crecimiento de (mm h ⁻¹)						
pH	T°	P°O ₂	a _w	Control ¹		Interacción 1 ²		Interacción 2 ³		
				Media ± DS		Media ± DS		Media ± DS		
4	37	normal	0,99	0 ± 0	f	0 ± 0	f	0 ± 0	f	
			0,95	0 ± 0	f	0 ± 0	f	0 ± 0	f	
		reducido	0,99	0 ± 0	f	0 ± 0	f	0 ± 0	f	
			0,95	0 ± 0	f	0 ± 0	f	0 ± 0	f	
	25	normal	0,99	0,35 ± 0,015	a	0,22 ± 0	bcd	0 ± 0	f	
			0,95	0,05 ± 0,05	ef	0 ± 0	f	0 ± 0	f	
		reducido	0,99	0,36 ± 0,015	a	0,19 ± 0,015	cd	0 ± 0	f	
			0,95	0 ± 0	f	0 ± 0	f	0 ± 0	f	
	6	37	normal	0,99	0 ± 0	f	0 ± 0	f	0 ± 0	f
				0,95	0 ± 0	f	0 ± 0	f	0 ± 0	f
			reducido	0,99	0 ± 0	f	0 ± 0	f	0 ± 0	f
				0,95	0 ± 0	f	0 ± 0	f	0 ± 0	f
25		normal	0,99	0,18 ± 0,175	d	0,14 ± 0,015	de	0 ± 0	f	
			0,95	0,15 ± 0,015	de	0,07 ± 0,07	ef	0 ± 0	f	
		reducido	0,99	0,37 ± 0,015	a	0,30 ± 0,005	ab	0 ± 0	f	
			0,95	0,13 ± 0	de	0,06 ± 0,06	ef	0 ± 0	f	

¹ control: *Fusarium graminearum* sin levadura, ² interacción 1: *Fusarium graminearum* - *Saccharomyces cerevisiae* RC008, ³ interacción 2: *Fusarium graminearum* - *Saccharomyces cerevisiae* RC016. Letras distintas indican diferencias significativas (p <= 0,05).

2.6. Efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la fase de latencia de *Fusarium graminearum*

El análisis estadístico de los factores cepas de levadura (C), pH, temperatura (T°), disponibilidad de oxígeno (P°O₂), actividad de agua (a_w) sobre la fase de latencia mostró que C, pH, T° y a_w y la interacción de todos los factores fueron estadísticamente significativos (p <0,0001), mientras que P°O₂ no ejerció una diferencia significativa en la velocidad de crecimiento del hongo (Tabla 29).

La Tabla 30 muestra el efecto de las cepas de *S. cerevisiae* sobre la fase de latencia de *F. graminearum* bajo la interacción de diferentes condiciones ambientales. Mientras que *S. cerevisiae* RC016 aumentó al máximo la fase de latencia del hongo en todas las condiciones de crecimiento (ya que el hongo no creció) (p <0,05), *S. cerevisiae* RC008 logró aumentar significativamente la fase de latencia de *F. graminearum* a pH 6, 25°C y en la menor actividad de agua probada (0,95) (p <0,05).

Tabla 29. Significancia de los factores cepas (C), pH, temperatura (T°) disponibilidad de oxígeno (P°O₂), actividad de agua (a_w) y sus interacciones con fase de latencia de *Fusarium graminearum*.

Factores	gl	CM	F	Pr (>F)
C	2	52706,91	294,70	<0,0001
pH	1	7254,50	40,56	<0,0001
T°	1	203397,99	1137,25	<0,0001
P°O ₂	1	78,32	0,44	0,5097
a _w	1	43237,66	241,75	<0,0001
C:pH:T°:P°O ₂ :a _w	41	6231,49	34,84	<0,0001

gl: grados de libertad, CM: cuadrado medio F: valor de F-Snedecor.

Tabla 30. Efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la fase de latencia de *Fusarium graminearum* en interacción con diferentes condiciones de pH, temperatura (T°), disponibilidad de oxígeno (P°O₂) y actividad de agua (a_w).

Condiciones de crecimiento				Fase de latencia (h)						
pH	T°	P°O ₂	a _w	Control ¹		Interacción 1 ²		Interacción 2 ³		
				Media ± DS		Media ± DS		Media ± DS		
4	37	normal	0,99	215 ± 0	a	215 ± 0	a	215 ± 0	a	
			0,95	215 ± 0	a	215 ± 0	a	215 ± 0	a	
		reducido	0,99	215 ± 0	a	215 ± 0	a	215 ± 0	a	
			0,95	215 ± 0	a	215 ± 0	a	215 ± 0	a	
	25	normal	0,99	50,86 ± 1,92	de	65,68 ± 1,2	d	215 ± 0	a	
			0,95	134,25 ± 4,25	b	215 ± 0	a	215 ± 0	a	
		reducido	0,99	40,96 ± 2,725	e	51,61 ± 3,45	de	215 ± 0	a	
			0,95	215 ± 0	a	215 ± 0	a	215 ± 0	a	
	6	37	normal	0,99	215 ± 0	a	215 ± 0	a	215 ± 0	a
				0,95	215 ± 0	a	215 ± 0	a	215 ± 0	a
			reducido	0,99	215 ± 0	a	215 ± 0	a	215 ± 0	a
				0,95	215 ± 0	a	215 ± 0	a	215 ± 0	a
25		normal	0,99	63,43 ± 3,43	d	21,29 ± 1,71	f	215 ± 0	a	
			0,95	94,45 ± 1,325	c	155,35 ± 59,64	b	215 ± 0	a	
		reducido	0,99	62,83 ± 7,83	d	45,48 ± 2,21	de	215 ± 0	a	
			0,95	56,71 ± 20,29	de	148,12 ± 66,87	b	215 ± 0	a	

¹ control: *Fusarium graminearum* sin levadura, ² interacción 1: *Fusarium graminearum* - *Saccharomyces cerevisiae* RC008, ³ interacción 2: *Fusarium graminearum* - *Saccharomyces cerevisiae* RC016. Letras distintas indican diferencias significativas (p ≤ 0,05).

3. Efecto de la interacción de *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de micotoxinas de *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus carbonarius* y *Fusarium graminearum*.

3.1. Efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la producción de aflatoxina B₁ de *Aspergillus parasiticus*.

El análisis estadístico de la interacción de cepas de levadura (C), pH, temperatura (T°) la disponibilidad de oxígeno (P°O₂), actividad de agua (a_w) sobre la producción de AFB₁ mostró que C, pH y P°O₂ fueron estadísticamente significativas (Tabla 31). La temperatura y la a_w no ejercieron una influencia significativa en la producción de aflatoxina B₁ (P <0,0001).

La producción de AFB₁ por *A. parasiticus* en diferentes condiciones de crecimiento se muestra en la Tabla 32. *Aspergillus parasiticus*, sin interactuar con cepas de levadura, fue capaz de producir *in vitro* grandes cantidades de AFB₁. Una gran disminución de los niveles de AFB₁ en comparación con el control (P <0,05) se observó con la interacción de las dos cepas de levadura, principalmente a pH 4. Ambas cepas, *S. cerevisiae* RC008 y *S. cerevisiae* RC016, alcanzaron los porcentajes de reducción más elevados a 25°C (P°O₂ normal y a_w 0,99) del 98% y 81% de AFB₁, respectivamente, y a 37°C (P°O₂ normal y a_w 0,99) los porcentajes de reducción fueron del 87% y del 96% para *S. cerevisiae* RC008 y RC016, respectivamente. La interacción *A. parasiticus*-*S. cerevisiae* fue eficaz en la reducción de AFB₁ a pH 6, presión de oxígeno normal y en ambas a_w estudiadas. *Saccharomyces cerevisiae* RC016 logró porcentajes de reducción superiores al 99% a 37°C (P°O₂ normal y a_w 0,99). No se observó aumento en la producción de AFB₁ en interacción con las levaduras en ninguna de las condiciones estudiadas.

Tabla 31. Significancia estadística de los factores cepas (C), pH, temperatura (T°) disponibilidad de oxígeno (P°O₂), actividad de agua (a_w) y sus interacciones sobre la producción de aflatoxina B₁ (AFB₁) de *Aspergillus parasiticus*.

Factores	gl	CM	F	Pr (>F)
C	2	17213291,21	119,53	<0,0001
pH	1	12538728,21	87,07	<0,0001
T°	1	306795,98	2,13	0,1477
P°O ₂	1	20140962,18	139,86	<0,0001
a _w	1	425451,80	2,95	0,0889
C:pH:T°:P°O ₂ :a _w	33	1763593,19	12,25	<0,0001

gl: grados de libertad, CM: cuadrado medio F: valor de F-Snedecor

Tabla 32. Efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la producción de aflatoxina B₁ (AFB₁) por *Aspergillus parasiticus* bajo diferentes condiciones de pH, temperatura (T°), disponibilidad de oxígeno (P°O₂) y actividad de agua (a_w).

Condiciones de crecimiento				Aflatoxina B ₁ (ng mL ⁻¹)						
pH	T°	P°O ₂	a _w	Control ₁		Interacción 1 ₂		Interacción 2 ₃		
				Media ± DS		Media ± DS		Media ± DS		
4	25	normal	0,99	347,5 ± 0,28	d	331,9 ± 12,5	d	44,4 ± 0,36	gh	
			0,95	793,6 ± 0,23	a	17,3 ± 0,4	h	150,9 ± 12,1	ef	
		reducido	0,99	680,0 ± 1,15	b	18,7 ± 9,45	h	517,5 ± 0,29	c	
			0,95	88,5 ± 23,4	fgh	28,9 ± 7,85	h	58,2 ± 2,15	fgh	
	37	normal	0,99	597,4 ± 0,34	bc	76,9 ± 3,4	fgh	24,2 ± 5,15	h	
			0,95	183,4 ± 44,7	e	123,9 ± 11,4	efg	54,4 ± 34	gh	
		reducido	0,99	607,5 ± 0,29	bc	46,1 ± 0,52	gh	7,6 ± 0,23	h	
			0,95	203,17 ± 184,7	e	31,8 ± 0,11	gh	10,0 ± 7,0	h	
	6	25	normal	0,99	2658 ± 813,2	c	791 ± 0,58	d	18,8 ± 0,12	d
				0,95	2583 ± 0,58	c	378,5 ± 42,4	d	189,1 ± 128	d
			reducido	0,99	67,1 ± 0,58	d	18,5 ± 0,29	d	55,0 ± 0,58	d
				0,95	50,0 ± 1,15	d	1,8 ± 1,8	d	28,67 ± 16	d
37		normal	0,99	4163 ± 4,84	b	703,6 ± 0,23	d	43,67 ± 57,5	d	
			0,95	5532 ± 1,15	a	124,2 ± 59	d	70,55 ± 40	d	
		reducido	0,99	42,9 ± 94,35	d	56,9 ± 34,4	d	23,9 ± 0,06	d	
			0,95	66,3 ± 47,5	d	11,0 ± 0,58	d	42,15 ± 2,25	d	

¹ control: *Aspergillus parasiticus* sin levadura, ² interacción 1: *Aspergillus parasiticus* - *Saccharomyces cerevisiae* RC008, ³ interacción 2: *Aspergillus parasiticus* - *Saccharomyces cerevisiae* RC016. Letras distintas indican diferencias significativas (p <= 0,05). En este análisis estadístico se comparó las medias con cada pH por separado.



3.2. Efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la producción de ocratoxina A de *Aspergillus carbonarius*.

El análisis estadístico de la interacción de cepas de levadura (C), pH, temperatura (T°) la disponibilidad de oxígeno ($P^\circ O_2$), actividad de agua (a_w) sobre la producción de OTA mostró que todas las condiciones estudiadas fueron estadísticamente significativas (Tabla 33) ($p < 0,0001$).

La producción de OTA por *A. carbonarius* en diferentes condiciones de crecimiento se muestra en la Tabla 34. En general, *A. carbonarius* sin interactuar con cepas de levadura a $25^\circ C$, fue capaz de producir *in vitro* grandes cantidades de la micotoxina.

Una gran disminución de los niveles de OTA en comparación con el control ($P < 0,05$) se observó con la interacción de las dos cepas de levadura, principalmente a $a_w 0,99$. Ambas cepas, *S. cerevisiae* RC008 y *S. cerevisiae* RC016, alcanzaron los porcentajes de reducción más elevados a pH 6 y $37^\circ C$ ($P^\circ O_2$ normal y $a_w 0,99$), del 100% y 99% de OTA, respectivamente, y a pH 6 y $25^\circ C$ ($P^\circ O_2$ reducida y $a_w 0,99$) los porcentajes de reducción fueron mayores al 99% para ambas cepas de *S. cerevisiae*.

No se observó aumento en la producción de OTA en interacción con las levaduras en ninguna de las condiciones estudiadas. En general, El hongo no fue capaz de producir la toxina a $37^\circ C$.

Tabla 33. Significancia estadística de los factores cepas (C), pH, temperatura (T°) disponibilidad de oxígeno (P°O₂), actividad de agua (a_w) y sus interacciones sobre la producción de ocratoxina A (OTA) de *Aspergillus carbonarius*.

Factores	gl	CM	F	Pr (>F)
C	2	94,89	41,28	<0,0001
pH	1	187,80	81,70	<0,0001
T°	1	537,44	233,81	<0,0001
P°O ₂	1	126,90	55,21	<0,0001
a _w	1	404,56	176,00	<0,0001
C:pH:T°:P°O ₂ :a _w	39	141,67	61,63	<0,0001

gl: grados de libertad, CM: cuadrado medio F: valor de F-Snedecor

Tabla 34. Efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la producción de ocratoxina A (OTA) por *Aspergillus carbonarius* bajo diferentes condiciones de pH, temperatura (T°), disponibilidad de oxígeno (P°O₂) y actividad de agua (a_w).

Condiciones de crecimiento				Ocratoxina A (µg mL ⁻¹)						
pH	T°	P°O ₂	a _w	Control ₁	Interacción 1 ₂		Interacción 2 ₃			
4	37	normal	0,99	0,13 ± 0,09	h	0,14 ± 0,03	h	0,15 ± 0,015	h	
			0,95	0,0 ± 0,0	h	0,0 ± 0,0	h	0,02 ± 0,016	h	
		reducida	0,99	0,05 ± 0,02	h	0,05 ± 0,02	h	0,05 ± 0,01	h	
			0,95	0,04 ± 0,03	h	0,03 ± 0,02	h	0,03 ± 0,02	h	
	25	normal	0,99	11,89 ± 1,94	b	4,04 ± 4,0	def	1,05 ± 0,0	gh	
			0,95	1,08 ± 0,35	gh	0,35 ± 0,0	h	0,15 ± 0,02	h	
		reducida	0,99	80,19 ± 21,2	i	47,19 ± 2,10	a	5,36 ± 3,70	de	
			0,95	3,03 ± 0,90	efg	1,11 ± 0,66	gh	2,99 ± 1,78	efg	
	6	37	normal	0,99	8,06 ± 7,90	c	0,0 ± 0,0	h	0,07 ± 0,01	h
				0,95	0,0 ± 0,0	h	0,01 ± 0,01	h	0,01 ± 0,01	h
			reducida	0,99	0,01 ± 0,0	h	0,0 ± 0,0	h	0,0 ± 0,0	h
				0,95	0,29 ± 0,17	h	0,14 ± 0,07	h	0,13 ± 0,05	h
25		normal	0,99	5,57 ± 0,0	d	0,98 ± 0,0	gh	0,28 ± 0,02	h	
			0,95	0,84 ± 0,21	gh	0,25 ± 0,19	h	0,13 ± 0,02	h	
		reducida	0,99	437,1 ± 62,9	j	0,34 ± 0,34	h	0,01 ± 0,01	h	
			0,95	4,81 ± 0,27	de	1,92 ± 0,04	fgh	1,57 ± 0,02	gh	

¹ control: producción de OTA de *Aspergillus carbonarius* sin levadura antagonista *Saccharomyces cerevisiae* RC008.

² interacción 1: producción de OTA de *Aspergillus carbonarius* en interacción con *Saccharomyces cerevisiae* RC008.

³ interacción 2: producción de OTA de *Aspergillus carbonarius* en interacción con *Saccharomyces cerevisiae* RC016.

3.3. Efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la producción de zearalenona de *Fusarium graminearum*.

La producción de ZEA por *F. graminearum* en diferentes condiciones de crecimiento se muestra en la Tabla 35. En general, *F. graminearum* sin interactuar con cepas de levadura a 25°C, fue capaz de producir *in vitro* grandes cantidades de ZEA, mientras que a 37°C no se observó producción de la toxina.

Una gran disminución de los niveles de ZEA en comparación con el control ($P < 0,05$) se observó en interacción con las dos cepas de levadura a pH 6 y 25°C, mientras que no se observaron diferencias significativas en la reducción de la micotoxina a pH 4 (25°C) entre el control y ambas interacciones.

S. cerevisiae RC008 alcanzó los porcentajes de reducción de ZEA más elevados a pH 6 y 25°C entre un 50,4 y 64,3 %. *S. cerevisiae* RC016 logró porcentajes de reducción superiores al 99% a pH 6 y 25°C ($P^{\circ}O_2$ normal y reducida - a_w 0,99 y 0,95).

No se observó aumento en la producción de ZEA en interacción con las levaduras en ninguna de las condiciones estudiadas.

Tabla 35. Efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la producción de zearalenona (ZEA) por *Fusarium graminearum* bajo diferentes condiciones de pH, temperatura (T°), disponibilidad de oxígeno (P°O₂) y actividad de agua (a_w).

CONDICIONES				Zearalenona (µg mL ⁻¹)						
pH	T°	P°O ₂	a _w	Control ₁	Interacción 1 ₂		Interacción 2 ₃			
4	37	normal	0,99	0,0 ± 0,0	f	0,0 ± 0,0	f	0,0 ± 0,0	f	
			0,95	0,0 ± 0,0	f	0,0 ± 0,0	f	0,0 ± 0,0	f	
		reducida	0,99	0,0 ± 0,0	f	0,0 ± 0,0	f	0,0 ± 0,0	f	
			0,95	0,0 ± 0,0	f	0,0 ± 0,0	f	0,0 ± 0,0	f	
	25	normal	0,99	1,73 ± 0,1	f	1,7 ± 0,16	f	0,34 ± 0,2	f	
			0,95	2,11 ± 1,7	f	0,03 ± 0,01	f	0,0 ± 0,0	f	
		reducida	0,99	2,56 ± 0,57	ef	3,0 ± 0,23	def	0,02 ± 0,01	f	
			0,95	0,0 ± 0,0	f	0,0 ± 0,0	f	0,0 ± 0,0	f	
	6	37	normal	0,99	0,0 ± 0,0	f	0,0 ± 0,0	f	0,0 ± 0,0	f
				0,95	0,0 ± 0,0	f	0,0 ± 0,0	f	0,0 ± 0,0	f
			reducida	0,99	0,0 ± 0,0	f	0,0 ± 0,0	f	0,0 ± 0,0	f
				0,95	0,0 ± 0,0	f	0,0 ± 0,0	f	0,0 ± 0,0	f
25		normal	0,99	17,43 ± 2,02	a	6,23 ± 0,98	cde	0,0 ± 0,0	f	
			0,95	15,57 ± 2,82	ab	9,29 ± 7,0	c	0,02 ± 0,01	f	
		reducida	0,99	8,03 ± 1,2	cd	3,73 ± 1,3	def	0,05 ± 0,02	f	
			0,95	13,30 ± 4,5	b	6,6 ± 5,0	cd	0,01 ± 0,001	f	

¹ control: producción de ZEA de *Fusarium graminearum* sin levadura antagónica. RC008.

²interacción 1: producción de ZEA de *Fusarium graminearum* en interacción con *Saccharomyces cerevisiae* RC008.

³interacción 2: producción de ZEA de *Fusarium graminearum* en interacción con *Saccharomyces cerevisiae* RC016.

La contaminación por micotoxinas en los cultivos pone en peligro la seguridad de los alimentos y causa importantes pérdidas económicas cada año.

Entre las estrategias para reducir o eliminar la contaminación por micotoxinas, el control biológico es una de las más prometedoras. En este trabajo de tesis, diferentes cepas de *S. cerevisiae* influenciaron significativamente el crecimiento de *A. parasiticus*, *A. carbonarius*, *F. graminearum* además de impactar sobre la producción de sus micotoxinas.

La selección de los agentes de control biológico comienza con el aislamiento de microorganismos a partir de nichos ecológicos similares en los que actuará, por esto es importante considerar la relación entre las interacciones microbianas y los factores ambientales.

En las secciones anteriores se demostró que las cepas *S. cerevisiae* RC008 y RC016 fueron las más eficientes en la decontaminación de las diferentes micotoxinas ensayadas por lo que se decidió continuar con estas cepas para los estudios ecofisiológicos de hongos toxicogénicos.

En este estudio, *S. cerevisiae* RC008 y RC016 nativos de medio ambiente animal fueron capaces de inhibir *in vitro* el crecimiento de hongos micotoxigénicos y producir una significativa reducción en la producción de AFB₁, OTA y ZEA, en diferentes condiciones ambientales que prevalecen en el ensilaje.

Diferentes estudios se han llevado a cabo para estudiar la influencia de factores ambientales en el crecimiento y la producción de micotoxinas por hongos filamentosos. En algunos estudios se pretendió conocer el comportamiento ecofisiológico de hongos toxicogénicos, mientras que otros aplicaron estrategias para prevenir la proliferación de hongos y la producción de micotoxinas mediante el uso de antioxidantes o bacterias (Cavaglieri y col, 2004; Passone y col, 2007; Barberis y col, 2010). Se estudió el efecto de un antioxidante en la tasa de crecimiento y la producción de OTA por *Aspergillus* sección *Nigri* en los granos de maní (Barberis y col., 2010) y la producción de aflatoxina B₁ por *Aspergillus* sección *Flavi* (Passone y col., 2007) bajo diferentes condiciones de actividad de agua y temperatura, y se observó la inhibición total del crecimiento y la producción de micotoxinas. Mientras Cavaglieri y col. (2004) estudiaron el efecto del control biológico de rizobacterias sobre *F. verticillioides* y observaron que inhibió significativamente la producción de fumonisina B₁ (70-100%). Estos resultados son comparables a los observados en este trabajo, donde ambas cepas de *S. cerevisiae* fueron capaces de inhibir

significativamente el crecimiento de *A. parasiticus*, *A. carbonarius*, *F.graminearum* y la producción de AFB₁, OTA y ZEA. La Pena y col. (2004) estudiaron *in vitro* la actividad antagonista de *Kluyveromyces spp.* sobre *Aspergillus* sección Flavi en a_w y T° diferentes para prevenir la acumulación de aflatoxina B₁ en el almacenamiento poscosecha de maíz. Sin embargo, estos estudios nunca se llevaron a cabo con cepas nativas de levadura interactuando con las condiciones ambientales que prevalecen en el sustrato que se pretende conservar.

La efectividad de las levaduras para prevenir el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas ha sido demostrada en trabajos previos. Blevé y col. (2006) informaron que cepas de levaduras aisladas a partir de uvas redujeron la colonización de *A. carbonarius* y *A. niger* en este sustrato. La levadura *Pichia anomala* inhibió la producción de OTA por *A. ochraceus* en el medio agar extracto de malta (Petersson y col., 1998).

El valor nutricional del ensilado es comparable con forrajes frescos. La mayoría de trabajos publicados han informado las especies de hongos presentes y los niveles de micotoxinas en este sustrato (González Pereyra y col. 2008, 2011), sin embargo, aún no se ha ensayado la estrategia para controlar el crecimiento de hongos o la producción de micotoxinas en este ecosistema. Este estudio demostró que las cepas de *S. cerevisiae* que están presentes naturalmente en el ensilaje tienen un gran potencial en el control del crecimiento de hongos toxicogénicos y en la producción de micotoxinas. A pesar de que las cepas de levaduras han sido a menudo consideradas como microorganismos de deterioro en el ensilaje, los resultados obtenidos en el desarrollo de esta tesis indican un posible rol benéfico que *S. cerevisiae* desempeñaría en el ecosistema del ensilaje, ya que las cepas ensayadas podrían prevenir la contaminación micotoxinas.

Lee y Magan (1999) informaron que la capacidad de *Aspergillus* para colonizar el maíz y producir micotoxinas es sobre todo determinada por su capacidad competitiva en relación con otras especies. Según Valero y col. (2006), la reducción de la cantidad de OTA puede deberse a: (i) la limitación del crecimiento de los hongos productores de OTA (ii) el consumo de nutrientes específicos que son necesarios para la síntesis de OTA, (iii) la degradación de OTA por microorganismos antagonistas.

Se han sugerido varios posibles modos de acción para el control biológico de las levaduras, como la competencia por espacio y nutrientes y la producción de enzimas. Magliani y col. (1997) informaron que ciertas cepas de *S. cerevisiae* fueron capaces

de producir toxinas “killer”. Estas toxinas killer estarían afectando el crecimiento de hongos filamentosos (Polonelli y col, 1987; Polonelli y Morace, 1986).

CONCLUSIONES PARCIALES

La adición de *S. cerevisiae* RC008 y RC016 podría evitar el crecimiento de los hongos micotoxigénicos y la producción de micotoxinas en diferentes condiciones ambientales que prevalecen en el ecosistema de silos y prolongar así el almacenamiento seguro de los alimentos destinados a la producción animal.

Sección IV

Estudio de los procesos fermentativos estadísticamente diseñados
para la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

INTRODUCCIÓN A LA SECCIÓN

Desde la antigüedad los microorganismos se han utilizado para producir alimentos, de esta manera han formado parte integral de la dieta del hombre y de los animales, probablemente los primeros alimentos que contenían microorganismos fueron las leches fermentadas cuyo consumo permanece actualmente. La verdadera importancia de los microorganismos fue comprendida a comienzos del siglo pasado. Levaduras como *S. cerevisiae* y *Pichia pastoris* han sido empleadas para la producción de aditivos alimentarios por ser reconocidas como seguras (GRAS), por poseer una alta velocidad de multiplicación, por ser capaces de emplear un gran variedad de fuente de carbono, por no producir compuestos tóxicos, por presentar un contenido de proteína cruda entre 55 y 60% del peso seco; lo que ha permitido que sean aceptadas como alimentos o piensos (Wolf, 1996, Lee y col, 2000). A nivel mundial la producción de biomasa a partir de levaduras se ha incrementado con diversos fines, entre ellos la fabricación de preparados probióticos, además de decontaminante de micotoxinas. Algunos de los efectos probióticos informados son la producción de enzimas, vitaminas y aminoácidos, la adherencia a microvellosidades intestinales y por exclusión competitiva desplazan a los microorganismos patógenos; el efecto antagónico sobre los mismos, la regulación del pH y disminución del potencial redox, el aumento en la asimilación de los alimentos, la reducción de los niveles de colesterol, la estimulación del sistema inmune y la aceleración del reinicio de la actividad ovárica post-parto en vacas, entre otros (Hamilton, 1996, Oyetayo y col, 2005, Rivas y col., 2006). Se han estudiado cepas de *S. cerevisiae* subespecie *boulardii*, demostrando que producen beneficios en el TGI de los animales monogástricos, impidiendo la adherencia de bacterias patógenas al tracto digestivo, inhibiendo las toxinas bacterianas y promoviendo condiciones favorables para el crecimiento y producción de bacterias ácido lácticas (Lee y col, 2000). En animales monogástricos los probióticos a base de levaduras han sido suministrados simultáneamente durante la administración de antibióticos, durante cambios de formulación en las dietas, durante procesos diarreicos y en general, en todos aquellos procesos que promuevan la disminución de la microflora intestinal; lo cual ha sido reevaluado cuando se emplean bacterias ácido lácticas (BAL).

La producción industrial de *S. cerevisiae* como probiótico debe cuidar que las tecnologías de procesamiento empleadas garanticen su estabilidad, tanto en términos

de viabilidad (capacidad de reproducirse) como de actividad durante la vida útil (Carvalho y col., 2004). Las levaduras presentan, en general, mayor resistencia a cambios ambientales bruscos (gradientes de pH, cambios osmóticos, etc.) que las bacterias lácticas, así como menores requerimientos nutricionales que redundan en la reducción de costos en los procesos de producción. Además, la mayor ácido-tolerancia de los hongos respecto de las bacterias resulta una ventaja importante, tanto en las fermentaciones (ya que disminuye el riesgo de contaminación bacteriana), como en la calidad probiótica del producto obtenido. Todos estos factores resultarían beneficiosos durante la etapa de producción, así como durante el almacenamiento y consumo (Leroy y col., 2002, Singh y col, 2006, Pardo y col., 2009). En la bibliografía clínica, se describe desde hace ya muchos años una levadura probiótica con propiedades bioterapéuticas comprobadas, identificada como *Saccharomyces boulardii*. Con esta denominación se expenden distintos productos comerciales, aunque varios estudios taxonómicos señalan que dicha levadura debería considerarse como una variedad de la especie *Saccharomyces cerevisiae* (*Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*) (McCullough y col, 1998, Van der Aa Kühle y col, 2005).

Para llevar a cabo la producción de biomasa de *S. cerevisiae* se debe seleccionar un sustrato económico, factor relevante en los procesos industriales, que aporte los nutrientes para el crecimiento y reproducción. Un sustrato que cumple con las condiciones descritas anteriormente, es la melaza de caña, ya que contiene compuestos que favorecen el desarrollo de la biomasa como altos contenidos de carbohidratos (sacarosa, glucosa y fructosa), proteínas, grasas, calcio, fósforo, aminoácidos y vitaminas, entre otros (Tabla 36) (Yépez, 1995; Téllez, 2004). La melaza es el subproducto de desecho mayoritario de las plantas de refinamiento de azúcar a partir de remolacha o de caña de azúcar. El principal azúcar presente en las melazas es la sacarosa (50-65 %), que es fácilmente asimilable por *S. cerevisiae* gracias a que posee una elevada actividad invertasa que le permite una rápida hidrólisis en glucosa y fructosa. Se ha demostrado que las melazas, a pesar de su bajo contenido en nitrógeno y fósforo, constituyen un buen medio nutritivo para muchos microorganismos, como hongos y bacterias (Zumbado- Rivera y col, 2006).

La propagación de las levaduras se inicia a partir de un crecimiento del cultivo puro a escala de laboratorio. A partir de él se inocula el primer fermentador de una secuencia de fermentaciones escalando a fermentadores de mayor volumen en cada paso. Las

primeras fermentaciones se realizan en condiciones de *batch* (cultivo discontinuo, todos los componentes se añaden desde el principio y no se renuevan) permitiendo que las células consuman el etanol producido antes de ser inoculadas en la siguiente fermentación. El resto de fermentaciones se realizan en condiciones de *fed-batch* (la alimentación del cultivo se hace de forma controlada a lo largo del proceso), favoreciendo el metabolismo respiratorio que permite obtener un gran rendimiento en biomasa, ya que la oxidación de la glucosa durante la respiración genera un rendimiento energético por mol de azúcar consumido mayor que el obtenido mediante el metabolismo fermentativo (Degre, 1993; Pérez-Torrado, 2004).

Para llevar a cabo la producción de biomasa de la levadura es fundamental realizar ensayos de optimización del medio de cultivo con el fin de seleccionar algunos factores categóricos que pudieran influenciar la producción de biomasa.

La implementación de diseños experimentales, se basan en una serie de técnicas que por medio de análisis estadísticos proveen una alternativa a los ensayos clásicos para mejorar procesos fermentativos con mayor eficiencia (Strobel y Sullivan, 1999). Esta metodología es particularmente útil ya que a través de experimentos cuidadosamente planeados se puede determinar el sub-conjunto de variables del proceso que tienen mayor influencia sobre la respuesta de interés (Montgomery, 2001); en este caso, la producción de biomasa.

El objetivo de la técnica de optimización estadística de un bioproceso implica la selección y mejoramiento de los niveles de las variables críticas para obtener un mayor rendimiento en el proceso fermentativo. Por otra parte, el análisis de datos mediante el empleo de métodos estadísticos permite trabajar con mayor objetividad científica en la obtención de conclusiones, ya que el efecto de cada una de las variables es dimensionado cuantitativamente, en lugar de estudiar la respuesta del microorganismo a distintas concentraciones de fuentes carbonadas y nitrogenadas en dos series de ensayos distintas, es posible probar todas las combinaciones simultáneamente en un bajo número de experimentos. Para la realización de un diseño experimental se utiliza una matriz matemática prefijada, que abarca una zona determinada de valores de las variables a estudiar, sin necesidad de recurrir a la realización exhaustiva de todas las combinaciones entre los mismos.

Tabla 36. Composición de melaza de azúcar de caña (Téllez y col., 2004)

Composición	Melaza de azúcar de caña
Materia Seca (%)	77-84
Sacarosa (%)	33,4
Azúcar invertido (%)	21,2
Materiales inorgánicos variados (%)	19,6
Nitrogeno (%)	0,4-1,5
P ₂ O ₅ (%)	0,6-2
CaO (%)	0,1-1,1
MgO (%)	0,03-0,1
K ₂ O (%)	2,6-5
Asche (%)	7-11
Tiamina (µg/100 g peso seco)	830
Riboflavina (µg/100 g peso seco)	250
Piridoxina (µg/100 g peso seco)	650
Niacinamida (µg/100 g peso seco)	2100
Acido pantoténico (µg/100 g peso seco)	2140
Acido fólico (µg/100 g peso seco)	3,8
Biotina (µg/100 g peso seco)	120

HIPÓTESIS

✓ La producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*, a través de procesos estadísticamente diseñados, mejora eficazmente los procesos fermentativos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Evaluar diferentes fuentes de carbono (glucosa, melaza, glicerol y etanol), a través de curvas de crecimiento y de parámetros cinéticos (velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación, para la utilización como sustrato en la producción de biomasa de *S. cerevisiae* RC016.

✓ Realizar la metodología de Diseños Estadísticos Experimentales (DOEs) en frascos agitados.

✓ Validar en fermentadores (condiciones de *batch*) las condiciones de proceso optimizadas en el punto anterior para la producción de biomasa de *S. cerevisiae*

MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología Industrial, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA)

1. Microorganismo

En este estudio se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* RC016, cepa con propiedades benéficas y adsorbente de micotoxinas (Secciones I, II y III). La cepa fue conservada en glicerol 30% (v/v) a -80°C y en tubos inclinados conteniendo medio YPD agar a 4°C .

2. Preparación del inóculo

Para la realización de curvas en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono, las células de la levadura mantenidas en estrias en medio YPD agar se sembraron en caldo YPD (20 mL) y se incubó a 28°C con agitación orbital (150 rpm), durante 24 h.

3. Curvas de crecimiento en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono (2%(g/v) de carbono): Yeast Nitrogen Base (YNB) suplementado con: melaza, glicerol, glucosa y etanol.

Para realizar el ensayo de obtención de curvas de crecimiento de la levadura se sembró 1 mL del inóculo inicial (5%v/v) en frascos Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 100 mL de diferentes medios:

- ✓ 10 mL de YNB suplementado con 90 mL de una solución de 3,92 g de melaza de caña de azúcar (70,5% de azúcares reductores fermentables, según información del proveedor) disuelto en agua destilada, con el fin de alcanzar una concentración en el medio de propagación del 2% de azúcares reductores fermentables.
- ✓ 10 mL de YNB suplementado con 90 mL de una solución de 2 g de glucosa disuelto en agua destilada, con el fin de alcanzar una concentración en el medio de propagación del 2% de azúcares reductores fermentables.

- ✓ 10 mL de YNB suplementado con 90 mL de una solución de 1,5 g de etanol (1,93 mL) disuelto en agua destilada, con el fin de alcanzar una concentración en el medio de propagación del 2% de azúcares reductores fermentables.
- ✓ 10 mL de YNB suplementado con 90 mL de una solución de 2,05 g de glicerol disuelto en agua destilada, con el fin de alcanzar una concentración en el medio de propagación del 2% de azúcares reductores fermentables.

Los frascos se incubaron con agitación orbital (250 rpm) a 28°C, y se tomaron alícuotas cada 4 h durante 66 h, para medir el crecimiento de la levadura (Pardo y col., 2009).

3.1. Crecimiento celular

3.1.1. Determinación de células viables

A partir de alícuotas de las muestras a estudiar, se realizaron diluciones sucesivas en agua peptonada (peptona de carne al 0,1%). Se sembraron por triplicado 20 μ L de cada dilución en placas de YPD. Las placas se incubaron durante 48 h a 28°C. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL^{-1}).

3.1.2. Concentración de levaduras totales

Se determinó mediante la medición de densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro Metrolab 330 (Technique SRL, Argentina) a una longitud de onda de 640 nm o por recuento microscópico en cámara de Neubauer.

3.1.3. Determinación del peso seco

Se tomaron alícuotas de 5 mL, se centrifugaron (5000 rpm, 10 min), se lavaron 3 veces con H_2O destilada. Posteriormente, las muestras secaron en estufa a 105°C hasta peso constante.

3.2. Parámetros cinéticos

Con los datos obtenidos de las curvas de crecimiento se determinaron parámetros cinéticos como velocidad específica de crecimiento μ_x (h^{-1}) y tiempo de duplicación t_d (h) en los diferentes medios ensayados.

4. Formulación de un medio de cultivo apropiado para la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 utilizando la metodología de los diseños experimentales estadísticos.

4.1. Preparación del inóculo

Las células de *S. cerevisiae* RC016 mantenidas en estrías se sembraron en medio melaza al 20% (p/v) y se incubaron durante 24 h a 28°C con agitación orbital (250 rpm).

Se utilizaron para cada tratamiento frascos Erlenmeyer de 100 mL, el volumen de trabajo fue de 20 mL (relación volumen de medio:volumen de frasco=1:5), con agitación a 250 rpm en frascos Erlenmeyer de 250 mL. Los frascos se incubaron con agitación orbital (250 rpm) a 28 y 37°C.

4.2. Diseños experimentales estadísticos y análisis de los resultados

Los diseños experimentales utilizados en este estudio fueron de dos tipos: diseños de selección y diseños de optimización. La respuesta analizada fue la producción de biomasa (DO_{640nm}) de *S. cerevisiae* RC016. Cada una de las k variables independientes estudiadas se codificó según la ecuación:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i}, \quad i=1,2,3\dots k \quad \text{Ecuación 1}$$

siendo x_i el valor codificado de la variable i , X_i su valor real, X_0 el valor que adopta la variable en el punto central (nivel 0), y ΔX_i la variación del parámetro entre el nivel cero y el nivel consecutivo a éste (superior o inferior).

4.2.1. Diseños de selección

Se utilizó el diseño de selección de Plackett-Burman para evaluar el efecto de las variables independientes sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* RC016 (Plackett y Burman, 1946). Los parámetros analizados fueron: concentración de melaza; concentración de Amonio Fosfato Dibásico (DAP); concentración de extracto de levadura; temperatura de incubación; tamaño del inóculo y tiempo de incubación.

4.2.2. Diseños de optimización

Se empleó el diseño de optimización central compuesto, o de Box-Wilson (Box y Wilson, 1951). Los parámetros del diseño de optimización fueron la concentración de melaza, la concentración de extracto de levadura (YE), y tiempo de incubación (para todos los tratamientos el tamaño del inóculo fue de 1% (v/v), la concentración de DAP fue de 10 g L⁻¹ y la temperatura de incubación fue de 28°C). El análisis de las respuestas se realizó según la Ecuación 2.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{j=2}^k \sum_{i=1}^{j-1} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 \quad \text{Ecuación 2}$$

Siendo y la respuesta observada, β_0 el coeficiente independiente, β_i el i -ésimo coeficiente lineal, β_{ij} el i,j -ésimo coeficiente interactivo, β_{ii} el i -ésimo coeficiente cuadrático.

4.3. Medición de producción de biomasa

La producción de biomasa de *S. cerevisiae* se determinó mediante la medición de DO en un espectrofotómetro Metrolab 330 (Technique SRL, Argentina) a una longitud de onda de 640 nm.

5. Validación del modelo: Fermentación en biorreactores (condiciones de *batch*) en condiciones optimizadas.

5.1. Preparación del inóculo

Las células de *S. cerevisiae* RC016 mantenidas en estrías se sembraron en tres Erlenmeyer de 500 mL, conteniendo 150 mL de medio preparado (esterilizado en autoclave, 120°C, 20 min) con las concentraciones optimizadas de melaza (17 g L⁻¹), extracto de levadura (4,6 g L⁻¹), DAP (10 g L⁻¹) y cloranfenicol (100 mg L⁻¹). Los tres frascos se incubaron durante 24 h a 28°C con agitación orbital (250 rpm).

5.2. Procedimiento del cultivo.

a) Termostatación (28°C) del biorreactor (Figura 20), modular provisto de un vaso de fermentación de vidrio de hasta 5 L de volumen de trabajo (BioFlo 110; New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ, EE.UU.). El fermentador utilizado fue de tipo

tanque agitado y aireado, equipado con dos series de seis agitadores (turbinas Rushton) y difusores (baffles) laterales

b) Conexión del filtro (previamente esterilizado) a la entrada de gases del biorreactor.

c) Arranque del sistema de agitación del biorreactor, fijando la agitación en 600 rpm.

d) Adición, en forma aséptica, del medio de cultivo (optimizado) al frasco de fermentación.

e) Calibración del electrodo para medir O_2 disuelto (Ag/AgCl, polarimétrico; Mettler Toledo Co., Columbus, OH, EE.UU.).

f) Calibración del electrodo para medir pH .

g) Inoculación del biorreactor. Se transvasó, en forma aséptica, el contenido de los tres erlenmeyers de preparación del inóculo al biorreactor.

h) Monitoreo de pH (En todos los casos, el pH se fijó entre 4,5-5 y se controló mediante adición automática de KOH 3 M o H_2SO_4 1,5 M) y O_2 disuelto (> 20% de saturación).

i) La producción de espuma se controló con el agregado de antiespumante siliconado comercial.

j) Toma de muestras del cultivo. Luego de 5 min se comenzó con el correspondiente muestreo, retirando 25 ml de muestra cada 3 h durante 60 h. En cada muestra se registró el volumen de muestra y el de descarte para realizar los cálculos correspondientes al volumen de medio en el biorreactor.

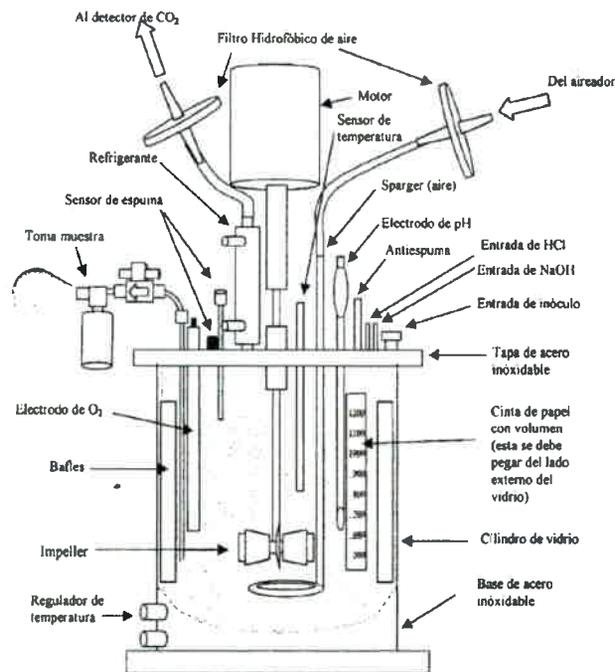


Figura 20. Esquema de biorreactor (Ferreira, 2006)

5.3. Medición de producción de biomasa

5.3.1. Determinación de células viables

A partir de alícuotas de las muestras a estudiar, se realizaron diluciones sucesivas en agua peptonada (peptona de carne al 0,1%). Se sembraron por triplicado 20 μL de cada dilución en placas de YPD. Las placas se incubaron durante 48 h a 28°C. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL^{-1}).

5.3.2. Concentración de levaduras totales

Se determinó mediante la medición de DO en un espectrofotómetro Metrolab 330 (Technique SRL, Argentina) a una longitud de onda de 640 nm.

6. Análisis de los resultados

Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico a través de análisis de la varianza (ANOVA) (software Essential Regression 2.205 y Origin 6.0 y Microsoft Excel 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Curvas de crecimiento en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono (2%(g/v) de carbono): YNB suplementado con: melaza, glicerol, glucosa y etanol.

En las Figuras 21-26 donde se presentan las curvas de crecimiento promedio de la levadura, se puede distinguir la fase de latencia o de adaptación de las células al medio. También se observa el momento en el que se llega a la fase estacionaria, donde no se observan cambios aparentes en la absorbancia con respecto al tiempo, lo que indica que no se está generando más masa celular. A partir de las curvas de crecimiento, es posible observar que la fase de adaptación duró entre 6 y 9 h. Para los cuatro medios ensayados se observó que *S. cerevisiae* presentó un tiempo más prolongado para alcanzar la fase estacionaria (56 h) en el medio con glucosa y melaza, mientras que alcanzó en los medios con glicerol y etanol la fase estacionaria más allá de 50 h de incubación a 28°C.

Al comparar los parámetros cinéticos (Tabla 37) de la levadura en los cuatro medios se observaron los mayores valores de velocidad de crecimiento ($1,8$ y $0,4$ h^{-1}) y menores tiempos de duplicación ($0,4$ y $1,9$ h) en los medios conteniendo glucosa y melaza, mientras que en los medios con glicerol y etanol, la velocidad de crecimiento fue menor ($0,2$ h^{-1} en ambos medios) y el tiempo de duplicación fue mayor ($3,4$ h en ambos medios).

En base a estos resultados se seleccionó el medio con melaza para los sucesivos ensayos de optimización por su efecto positivo en la crecimiento de *S. cerevisiae* RC016 y por considerarse un medio accesible industrialmente.

En la Figura 27 se observan los valores de peso seco de *S. cerevisiae* RC016 en medio con melaza. La mayor producción de biomasa produjo a las 51 h de crecimiento a 28°C, donde se obtuvo un peso total de 37 g L^{-1} , resultado mayor al obtenido por Zumbado-Rivera y col. (2006), quienes obtuvieron una biomasa de 18 g L^{-1} de una cepa de *S. cerevisiae* en medio con melaza (10% p/v).

El medio YPD es utilizado como sustrato para la obtención de *S. cerevisiae*, es un medio sintético, comercial, procesado y enriquecido con fuentes de carbono como glucosa y fuentes de nitrógeno como extracto de levadura y peptona (Fajardo- Castillo y col, 2007); sin embargo, éste resulta ser un medio costoso cuando se pretende

obtener biomasa a gran escala, por lo que es de gran utilidad obtener un sustrato económico y de fácil consecución para fines biotecnológicos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se utilizó en este estudio el medio melaza de caña para la producción de biomasa de *S. cerevisiae* RC016, cepa que tiene ventajas económicas y nutricionales como sales y minerales fundamentales para el crecimiento de la levadura. Además la melaza de caña, posee compuestos que favorecen el desarrollo de la biomasa como altos contenidos de carbohidratos, proteínas, grasa, calcio, fósforo, aminoácidos y vitaminas entre otros. Con la utilización de este sustrato se pretende minimizar los costos de producción a mayor escala y hacer buen uso de subproductos de la industria azucarera.

En trabajos previos también se ha utilizado la melaza de caña como sustrato para la producción de levaduras y coincidente con los resultados expuestos en este trabajo, lograron obtener una producción eficiente de biomasa de *S. boulardii* ($2-3 \times 10^8$ células mL⁻¹) (Pardo y col., 2009) y *Candida utilis* (11.78 g L⁻¹) (Cajo y col., 2011).

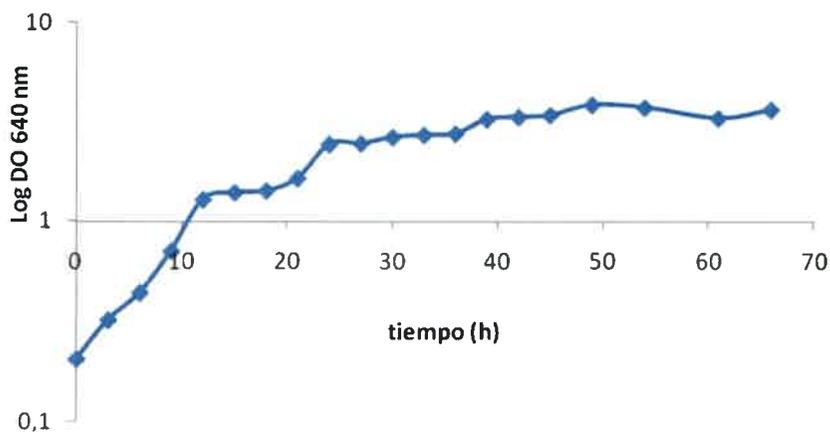


Figura 21. Curva de crecimiento ($\text{Log}_{10} \text{DO}_{640 \text{ nm}}$) de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 en medio con melaza en frascos agitados durante 66 h a 28°C.

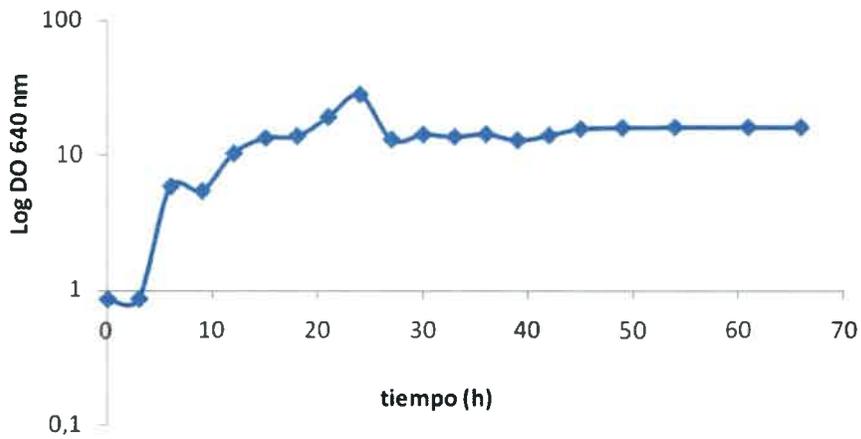


Figura 22. Curva de crecimiento ($\text{Log}_{10} \text{DO}_{640 \text{ nm}}$) de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 en medio con glucosa en frascos agitados durante 66 h a 28°C.

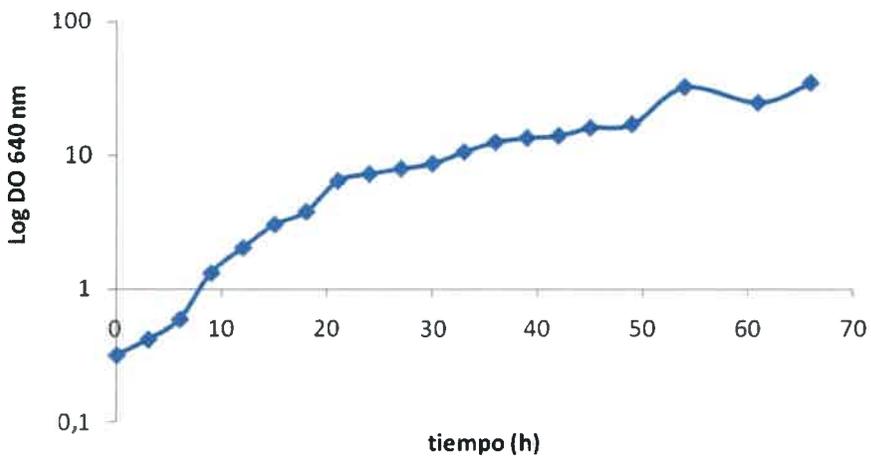


Figura 23. Curva de crecimiento ($\text{Log}_{10} \text{DO}_{640 \text{ nm}}$) de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 en medio con etanol en frascos agitados durante 66 h a 28°C.

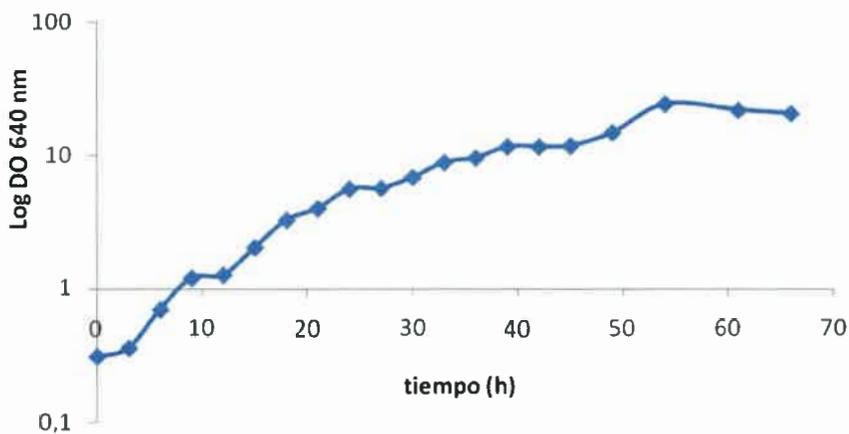


Figura 24. Curva de crecimiento ($\text{Log}_{10} \text{DO}_{640 \text{ nm}}$) de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 en medio con glicerol en frascos agitados durante 66 h a 28°C

Tabla 37. Velocidad específica de crecimiento (μ_{max}) y tiempo de duplicación (t_d) de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 en diferentes medios de cultivo.

Fuente de carbono	Velocidad específica de crecimiento (μ_{max})(h^{-1})	Tiempo de duplicación (t_d)(h)
Melaza	0,365	1,9
Glucosa	1,772	0,4
Etanol	0,201	3,45
glicerol	0,202	3,43

$\mu_{\text{max}} = \ln x - \ln x_0 / t - t_0$
 $t_d = \ln 2 / \mu$

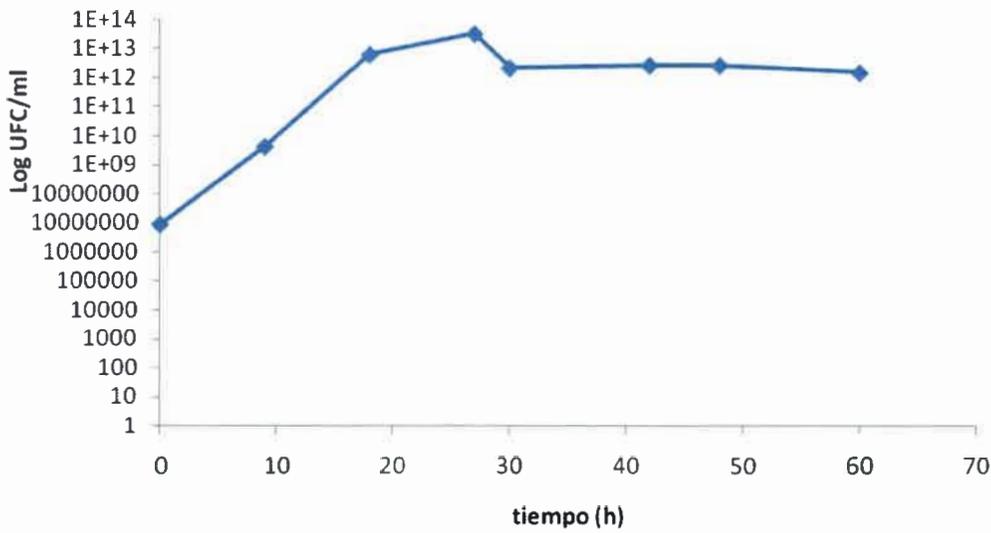


Figura 25. Curva de crecimiento (Log_{10} UFC mL^{-1}) de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 en medio con melaza en frascos agitados durante 66 h a 28°C

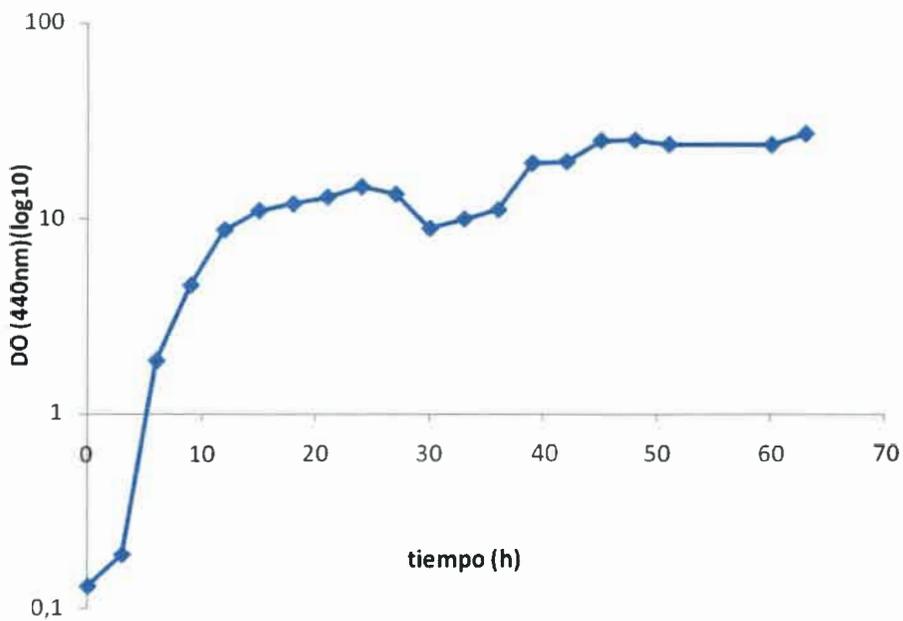


Figura 26. Curva de crecimiento (Log_{10} DO_{640 nm}) de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 en medio con melaza en frascos agitados durante 66 h a 28°C.

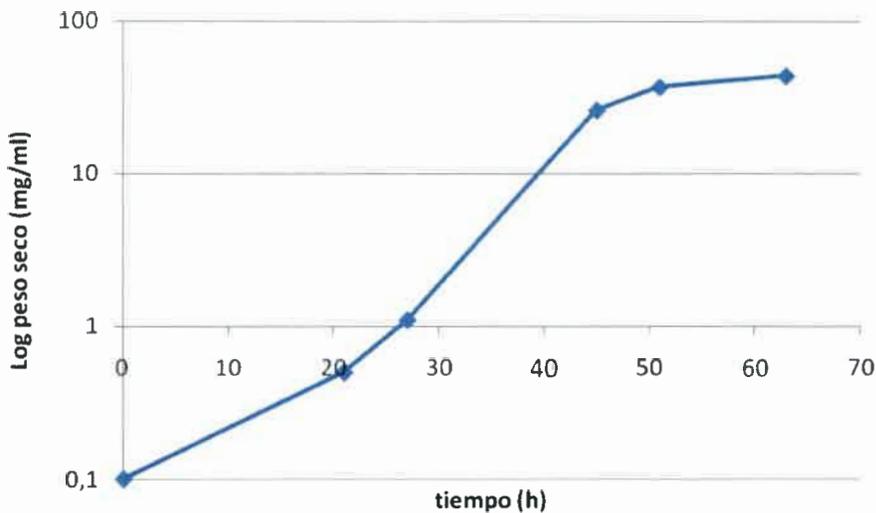


Figura 27. Curva de crecimiento (Log_{10} peso seco) de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 en medio con melaza en frascos agitados durante 66 h a 28 °C

2. Formulación de un medio de cultivo apropiado para la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 utilizando la metodología de los diseños experimentales estadísticos.

En esta sección se discuten algunos ensayos clásicos de optimización del medio de cultivo con el fin de seleccionar algunos factores categóricos que pudieran influenciar la producción de biomasa de *S. cerevisiae* RC016. Existen escasos informes en la literatura acerca de la utilización de diseños experimentales para optimizar la producción de biomasa de levaduras (Fajardo y Castillo, 2007; Rubio y col, 2008; Paz Astudillo, 2010).

En este trabajo de tesis, durante los ensayos preliminares se varió un factor por vez, manteniendo los demás factores constantes, con el objetivo de estimar el rango de influencia de los factores seleccionados. Esta información se aplicó a la implementación de diseños experimentales estadísticos, una serie de técnicas que por medio del análisis estadístico provee una alternativa a los ensayos clásicos para mejorar procesos fermentativos con mayor eficiencia (Strobel y Sullivan, 1999). Esta metodología es particularmente útil ya que a través de experimentos cuidadosamente planeados se pudo determinar el sub-conjunto de variables del proceso que tienen

mayor influencia sobre la respuesta de interés, en este caso, la producción de biomasa de *S. cerevisiae* RC016 (DO_{640nm}).

En este estudio, se realizó en primer lugar un diseño de selección, el cual consiste en un programa de mejoramiento del medio de cultivo que permite analizar los factores que tienen efectos significativos sobre la producción de biomasa de la levadura. El objetivo de esta etapa fue seleccionar un número pequeño y manejable de factores que afectasen significativamente la producción de biomasa de *S. cerevisiae* RC016. Los niveles óptimos de esas variables independientes fueron hallados en la etapa de optimización.

2.1. Diseños de selección de Plackett-Burman

El primer tipo de diseño realizado fue el diseño de selección de Plackett-Burman. Se trata de un diseño multifactorial a 2 niveles, el cual permite estimar los efectos lineales de cada factor, representándolos como la pendiente de una recta que conecta la media de las respuestas del factor en su nivel codificado menor (-1) y mayor (+1). El fundamento de esta técnica es la construcción racional de varias combinaciones (conjuntos experimentales) de los componentes a analizar. Con este diseño se puede estudiar el efecto de $N-1$ factores en N ensayos (cada uno correspondiente a un conjunto experimental distinto), donde N es múltiplo de 4. En todos los diseños se agregan puntos centrales (*i.e.*, nivel 0) por triplicado para calcular el error puro del método.

Es importante destacar que en cada uno de los diseños experimentales las variables se codificaron según la Ecuación 1.

Las variables independientes analizadas fueron las concentraciones de melaza, DAP, extracto de levadura, tiempo de cultivo; y tamaño de inóculo (Tabla 38).

Tabla 38. Diseño de selección de Plackett-Burman y respuesta observada para analizar el efecto de distintos factores (variables) nutricionales y fisicoquímicas sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* RC016.

Ensayo	Factor										Respuesta (DO _{640nm})
	Melaza (%)	DAP ^a (g L ⁻¹)			Extracto de levadura ^b (g L ⁻¹)		Inóculo (%)		Tiempo ^c (h)		
1	+1 ^d	20	-1	0	+1	3	+1	2	-1	20	27,4
2	-1	5	-1	0	+1	3	+1	2	+1	48	40,6
3	0	12,5	0	5	0	1,5	0	1,25	0	34	36,5
4	-1	5	-1	0	-1	0	-1	0,5	-1	20	5,67
5	0	12,5	0	5	0	1,5	0	1,25	0	34	35,5
6	+1	20	-1	0	-1	0	-1	0,5	+1	48	29,2
7	+1	20	+1	10	+1	3	-1	0,5	+1	48	54,8
8	-1	5	+1	10	+1	3	-1	0,5	+1	48	36,9
9	+1	20	+1	10	-1	0	+1	2	-1	20	26,5
10	0	12,5	0	5	0	1,5	0	1,25	0	34	35,1
11	+1	20	+1	10	-1	0	+1	2	+1	48	53,7
12	-1	5	+1	10	+1	3	+1	2	-1	20	25,0
13	-1	5	-1	0	-1	0	+1	2	+1	48	9,8
14	+1	20	-1	0	+1	3	-1	0,5	-1	20	23,9
15	-1	5	+1	10	-1	0	-1	0,5	-1	20	21,8

^aConcentración de amonio fosfato dibásico. ^bConcentración de extracto de levadura. ^cTiempo de incubación. ^dNúmeros en la primera columna son los valores codificados de las variables. Todos los ensayos se realizaron a 28°C.

El análisis matemático del diseño ajustó las respuestas obtenidas mediante una función de primer orden a 5 variables (parámetros del diseño), cuyos coeficientes lineales se obtuvieron por análisis de regresión múltiple. La regresión se realizó por el método de cuadrados mínimos, minimizando el error residual, representado por la suma de cuadrados de las diferencias entre los valores de respuesta observados y los

valores estimados por el modelo. En la Tabla 39 se presentan los resultados del análisis estadístico, los coeficientes de determinación y los errores estándar, así como los valores t y P para cada uno de los coeficientes. El test estadístico por el cual se analizó el modelo aplicado fue ANOVA, y su significación fue estudiada a través del test F de Fischer. Los valores de los coeficientes β_i de la ecuación de regresión están relacionados con los valores codificados de los parámetros independientes y las respuestas obtenidas para cada combinación de los mismos. El valor absoluto de cada coeficiente de la regresión es proporcional al efecto que éste tiene sobre la respuesta. Así, un valor absoluto elevado para un coeficiente determinado implica que el efecto del mismo será notable (positivo o negativo, dependiendo del signo de β_i), mientras que si tiende a cero el factor tendrá un efecto menor. Para estudiar la significancia de cada factor se analizan los valores t (del test t de Student) y P (de ANOVA) de su coeficiente de regresión.

El análisis estadístico del modelo, a través de ANOVA, reveló que la ecuación de primer orden elegida para interpretar las observaciones experimentales fue adecuada y significativa.

Normalmente, un modelo de regresión que presente un valor del coeficiente de determinación $0,7 \leq R^2 \leq 0,9$ se considera de alta correlación (Kennedy y Krouse, 1999). En este diseño experimental, el coeficiente de determinación para biomasa resultó ser $R^2 = 0,822$ (sólo un 17,8% de las variaciones no pudo ser explicado por el modelo). El valor del coeficiente de determinación ajustado (R^2 ajustado) fue 0,724. Este valor indica que el modelo no está 'sobre-ajustado' por el grado del polinomio empleado (o dicho de otro modo, el modelo lineal ajusta adecuadamente). El valor del estadístico F significativo indicó que los resultados obtenidos a partir del modelo fueron altamente significativos ($P < 0,05$).

Como se demuestra por análisis estadístico del modelo aplicado, cuatro (4) variables tuvieron un efecto significativo ($P < 0,05$, marcadas en negrita en las ecuaciones precedentes), las cuales fueron: concentración de melaza (b_1), concentración de DAP (b_2), concentración de extracto de levadura (b_3) y tiempo de incubación (b_4), mientras que el tamaño del inóculo no influyó significativamente la producción de biomasa de *S. cerevisiae* RC016.

La Figura 28 ilustra el efecto positivo de la concentración de melaza, DAP, extracto de levadura y el tiempo de incubación sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* RC016 (DO_{640nm}).

Tabla 39: ANOVA del modelo aplicado para producción de biomasa (DO_{640nm}) de *S. cerevisiae* RC016.

Summary						
R	0,907					
R ²	0,822					
R ² adjusted	0,724					
Standard Error	7,127					
# Points	15					
PRESS	1524,77					
R ² for Prediction	0,407					
Durbin-Watson d	0,773					
First Order Autocorrelation	0,563					
Collinearity	1,000					
Coefficient of Variation	23,120					
Precision Index	114,895					
ANOVA						
Source	SS	SS%	MS	F	F Signif	df
Regression	2115,4	82	423,08	8,329	0,00344	5
Residual	457,17	18	50,80			9
		18				
LOF Error	456,13	(100)	65,16	125,3091	0,00794	7
Pure Error	1,040	0 (0)	0,520			2
Total	2572,6	100				14

$$DO_{640} = b_0 + b_1 * \text{Melaza (\%)} + b_2 * \text{DAP (g L}^{-1}\text{)} + b_3 * \text{extracto de levadura (g L}^{-1}\text{)} + b_4 * \text{Inóculo(\%)} + b_5 * \text{tiempo (h)}.$$

	P	Error	-95%	95%	t Stat	VIF
b0	-12,34	0,147	7,768	-29,91	5,233	1,589
b1	0,841	0,01344	0,274	0,221	1,462	3,066
b2	1,368	0,00886	0,411	0,437	2,299	3,325
b3	3,439	0,03347	1,372	0,336	6,542	2,507
b4	0,119	0,675	0,274	-0,502	0,739	0,433
b5	0,564	0,00399	0,147	0,231	0,896	3,836

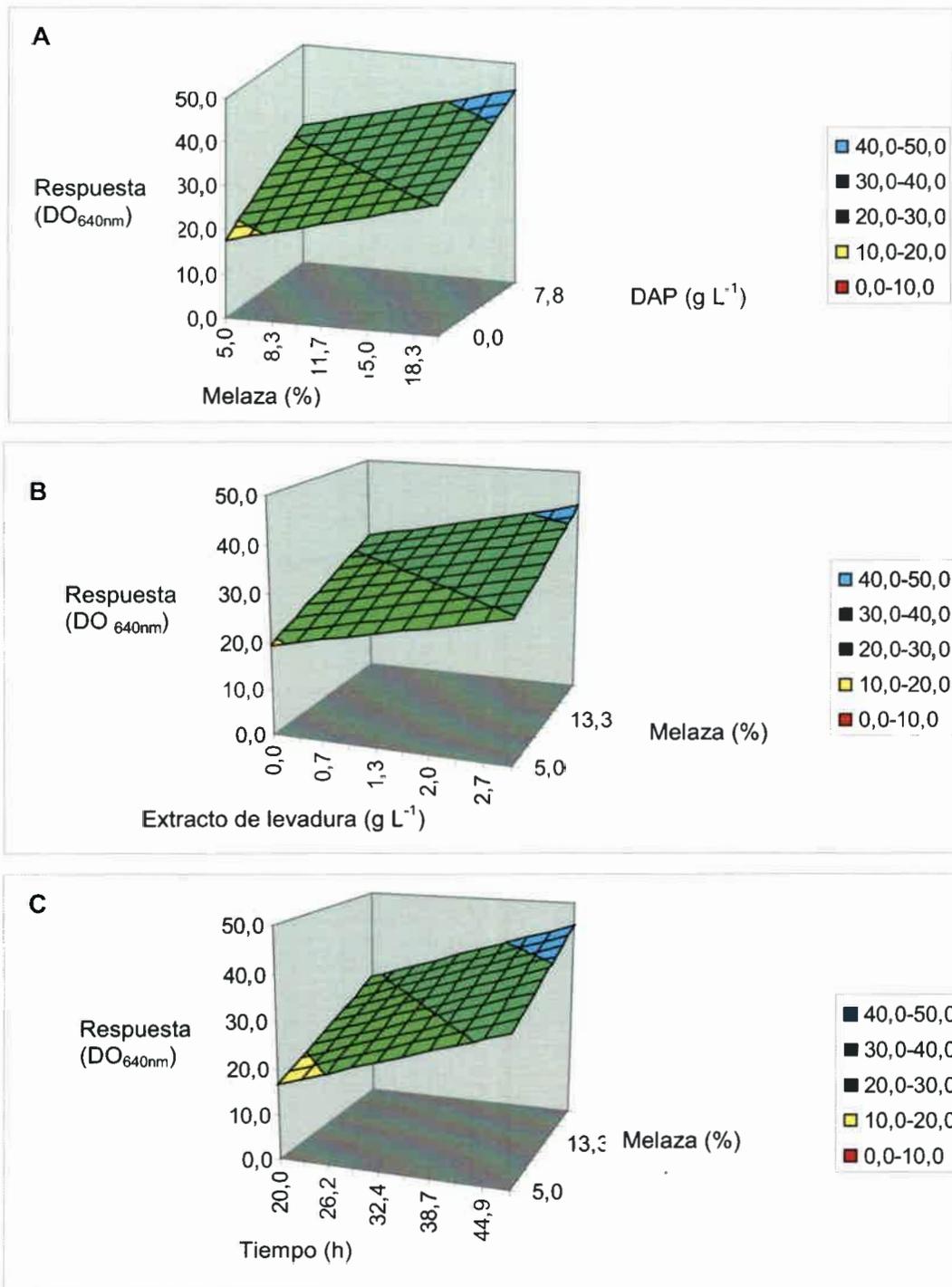


Figura 28. Gráfico de superficie de DO en función de (A) porcentaje de melaza y concentración de DAP. (B) concentración de extracto de levadura y porcentaje de melaza y (C) tiempo y porcentaje de melaza para el diseño de selección de Plackett-Burman.

2.2. Diseños de optimización (Diseño Central Compuesto)

Los 4 factores significativos seleccionados en esta primera etapa (los cuales, a su vez, presentan relevancia desde el punto de vista del proceso industrial a mayor escala) se optimizaron utilizando un diseño central compuesto con el objetivo de maximizar la producción de biomasa de la levadura.

El diseño elegido resulta apropiado cuando el número de factores a optimizar comprende entre 2 y 4 variables (Box y Wilson, 1951). El modelo experimental incluye un diseño factorial con dos niveles codificados para cada variable, más la cantidad necesaria de puntos (dependiendo del número de factores) para estimar la curvatura e interacción de los parámetros en estudio en el rango de valores adoptado por cada uno. Para el análisis de los resultados obtenidos y la optimización se utilizó la metodología de superficies de respuesta obtenidas por análisis de regresión múltiple.

Esta metodología tiene como objetivos: i) estudiar efectos previamente observados o supuestos (interacciones), ii) estimar la curvatura o efectos cuadráticos, y iii) determinar en forma cuantitativa los valores más apropiados para los parámetros en estudio de modo de maximizar la respuesta. El diseño central compuesto puede tener distintas características como *rotabilidad*, *ortogonalidad*, y *uniformidad*. La propiedad deseable del diseño de Box-Wilson es la *rotabilidad* (Kennedy y Krouse, 1999); es decir la varianza de los valores estimados constante en puntos equidistantes al centro del diseño. Los niveles de las variables estudiadas y el desarrollo del diseño experimental de optimización se muestran en las Tablas 40 y 41.

Tabla 40. Diseño central compuesto para la optimización y respuestas medidas.

Ensayo	Factor						Respuesta (DO 640nm)
	Melaza (%)	Extracto de levadura ^b (g L ⁻¹)			Tiempo ^c (h)		
1	0 ^a	20	0	3	0	42	51,1
2	+1	30	+1	5	+1	60	55,9
3	-1	10	-1	1	+1	60	51,0
4	+1	30	-1	1	-1	24	26,0
5	0	20	0	3	+1	60	66,8
6	-1	10	+1	5	+1	60	66,7
7	0	20	0	3	0	42	52
8	-1	10	+1	5	-1	24	29,6
9	-1	10	-1	1	-1	24	31,8
10	+1	30	-1	1	+1	60	51,1
11	0	20	-1	1	0	42	41,1
12	+1	30	+1	5	-1	24	25,5
13	-1	10	0	3	0	42	44,7
14	0	20	+1	5	0	42	48,7
15	0	20	0	3	-1	24	32,4
16	0	20	0	3	0	42	53,3
17	+1	30	0	3	0	42	40,6

^a Los números en la primera columna son los valores codificados de las variables. ^b Concentración de extracto de levadura. ^c Tiempo de incubación. Todos los ensayos se realizaron con un porcentaje de inóculo de 1%, concentración DAP de 10 g L⁻¹ a 28°C y 250 rpm.

En este caso, los resultados experimentales fueron interpretados a través de un modelo de segundo orden, el cual considera todas las posibles interacciones entre los

factores, así como los términos cuadráticos. Este modelo resultó ser adecuado con un nivel de confianza del 95% según ANOVA, test F de Fischer, y $R^2 = 0,972$. El análisis de regresión múltiple, a su vez, arrojó los resultados que se muestran en la tabla 25, en la cual se incluyen también los resultados del test t de Student, y los correspondientes valores del estadístico P .

Tabla 41. ANOVA del modelo aplicado para producción de biomasa (DO_{640nm}) de *S. cerevisiae* RC016.

Summary	
R	0,986
R^2	0,972
R^2 adjusted	0,937
Standard Error	3,244
# Points	17
PRESS	764,31
R^2 for Prediction	0,712
Durbin-Watson d	1,159
First Order Autocorrelation	0,268
Collinearity	0,000
Coefficient of Variation	7,174
Precision Index	59,701

ANOVA						
Source	SS	SS%	MS	F	F Signif	df
Regression	2583,6	97	287,06	27,28	0,000122	9
Residual	73,67	3	10,52			7
LOF Error	71,94	3 (98)	14,39	16,6658	0,05757	5
Pure Error	1,727	0 (2)	0,863			2
Total	2657,2	100				16

Respuesta (DO_{640nm}) = $b_0 + b_1 \cdot \text{Melaza (\%)} + b_2 \cdot \text{extracto de levadura (g L}^{-1}\text{)} + b_3 \cdot \text{tiempo (h)} + b_4 \cdot \text{Melaza(\%)} \cdot \text{Melaza(\%)} + b_5 \cdot \text{extracto de levadura (g L}^{-1}\text{)} \cdot \text{extracto de levadura (g L}^{-1}\text{)} + b_6 \cdot \text{tiempo(h)} \cdot \text{tiempo(h)} + b_7 \cdot \text{Melaza(\%)} \cdot \text{extracto de levadura (g L}^{-1}\text{)} + b_8 \cdot \text{Melaza(\%)} \cdot \text{tiempo(h)} + b_9 \cdot \text{extracto de levadura (g L}^{-1}\text{)} \cdot \text{tiempo(h)}$.

		P value	Std Error	-95%	95%	t Stat	VIF
b0	-2,006	0,869	11,74	-29,77	25,76	-0,171	
b1	2,284	0,03273	0,860	0,249	4,318	2,654	70,34
b2	4,418	0,247	3,494	-3,844	12,68	1,264	46,40
b3	0,293	0,605	0,541	-0,986	1,572	0,542	90,10
b4	-0,05837	0,02155	0,01982	-0,105	-0,01151	-2,945	61,26
b5	-0,897	0,113	0,495	-2,068	0,275	-1,810	35,13
b6	0,00343	0,592	0,00612	-0,01103	0,01790	0,561	82,82
b7	-0,05750	0,349	0,05735	-0,193	0,07810	-1,003	8,813
b8	-0,000556	0,933	0,00637	-0,01562	0,01451	-0,08719	12,81
b9	0,08056	0,03932	0,03186	0,00522	0,156	2,528	10,62

Como puede observarse, la concentración de melaza y la interacción entre la concentración de extracto de levadura y el tiempo de incubación fueron significativos ($p < 0,05$).

Los gráficos de superficies de respuesta descritos por el modelo fueron construidos a partir de las combinaciones de los pares de factores, manteniendo el tercer factor a nivel cero, para ilustrar los efectos principales de las variables y sus efectos interactivos sobre la producción de biomasa de *S. cerevisiae* RC016 (Figura 34). La naturaleza elíptica de los gráficos de contorno indica que las interacciones entre las variables independientes fueron significativas (Figura 34 C). Estos resultados se asemejan a los informados por Diaz y col. (2005) quienes optimizaron el medio de cultivo para la producción de *Pichia onychis* a través de herramientas estadísticas y diseño de experimentos. Estos autores observaron, a partir del análisis de las superficies de respuesta obtenidas al aplicar un diseño central compuesto, que la magnitud de los factores influyen significativamente en la obtención de una respuesta óptima.

El análisis gráfico de las superficies de respuesta (Figura 29) permite observar que la producción de biomasa de la levadura a través de las distintas combinaciones posibles entre los parámetros conduce a valores de respuesta mayores conforme se consideran puntos más internos del espacio experimental. Esto permite suponer la existencia de una combinación óptima de los parámetros que maximiza la producción de biomasa. Para obtener dicha combinación óptima de valores codificados es necesario hallar el máximo de la función cuadrática que interpreta las respuestas

(Tabla 42). **Los valores reales para las variables independientes que corresponden al punto estacionario son melaza 17%; extracto de levadura (YE) 4,61 g L⁻¹ y tiempo de incubación 60 h. En dichas condiciones, el modelo predice una respuesta máxima de 68,42 (DO_{640nm}) para la producción de biomasa de *S. cerevisiae* RC016.**

Similares resultados a los presentados en este trabajo de tesis fueron informados por Ortiz y col. (2008) quienes evaluaron la concentración de melaza de caña óptima para el desarrollo de una cepa nativa de *S. cerevisiae* con propiedades probióticas y concluyeron que la concentración de melaza que arrojó mejores resultados fue 20% (p/v).

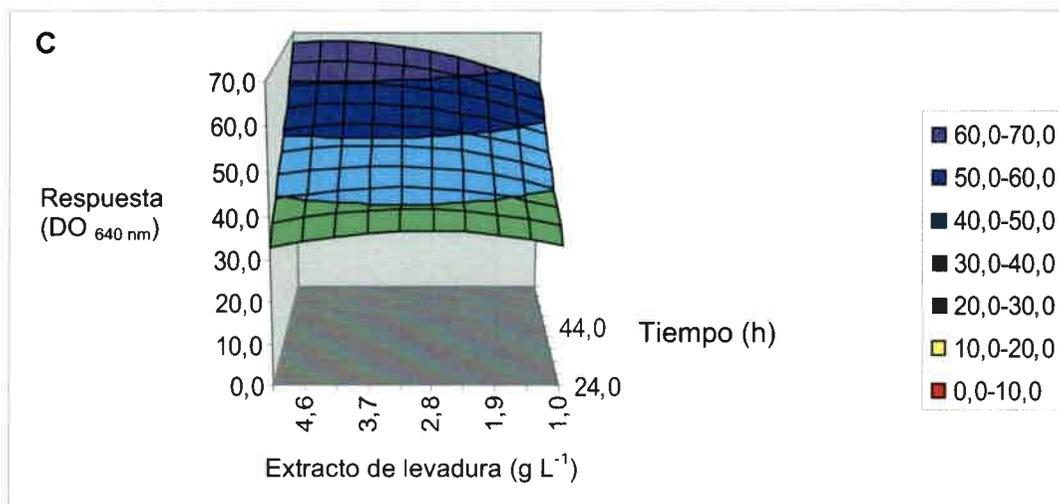
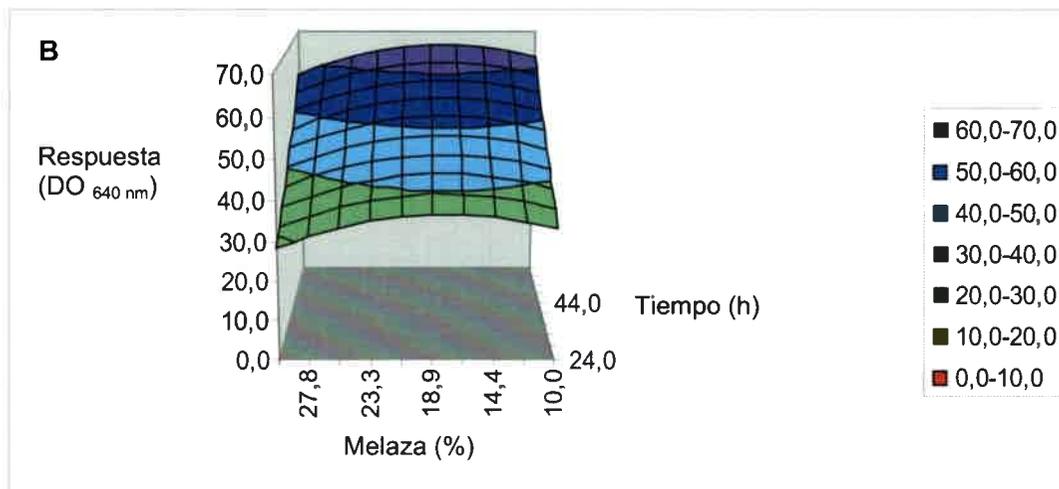
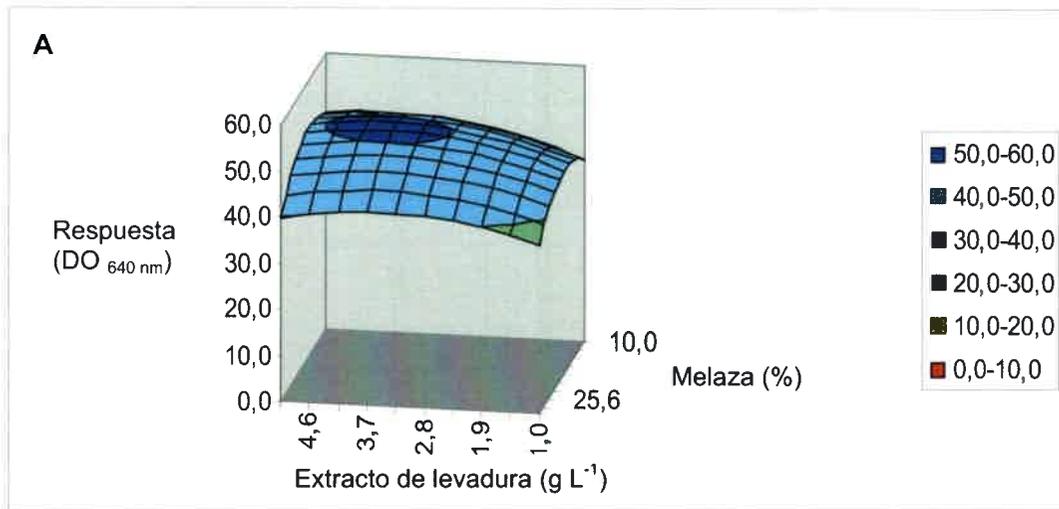


Figura 29. Análisis de superficies de respuesta para el diseño de optimización que muestra el efecto sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* RC016 (DO_{640nm}) (A) de concentración de melaza (%) y extracto de levadura (g L⁻¹), (B) de concentración de melaza (%) y tiempo (h) y (C) extracto de levadura (g L⁻¹) y tiempo (h). La escala de colores muestra los niveles de producción de biomasa de la levadura.

Tabla 42. Resultados obtenidos en las variables independientes utilizando el análisis matemático de optimización.

MÁXIMO

<i>Term</i>	<i>Melaza(%)</i>	<i>Extracto de levadura(g L⁻¹)</i>	<i>Tiempo (h)</i>
Data Min	10	1	24
Data Avg	20	3	42
Data Max	30	5	60
Cur Value	17,0044627	4,61247965	60

Respuesta (DO_{640nm})= **68,4176159**

MÍNIMO

<i>Term</i>	<i>Melaza (%)</i>	<i>Extracto de levadura (g L⁻¹)</i>	<i>Tiempo (h)</i>
Data Min	10	1	24
Data Avg	20	3	42
Data Max	30	5	60
Cur Value	30	1	24

Respuesta (DO_{640nm})= **26,3150704**

Para validar este modelo se llevaron a cabo fermentaciones en biorreactores en condiciones optimizadas para confirmar si existió una correlación entre la respuesta predicha y la respuesta experimental y de esta forma evidenciar la adecuación del modelo elegido.

3. Validación del modelo: Fermentación en biorreactores en condiciones optimizadas.

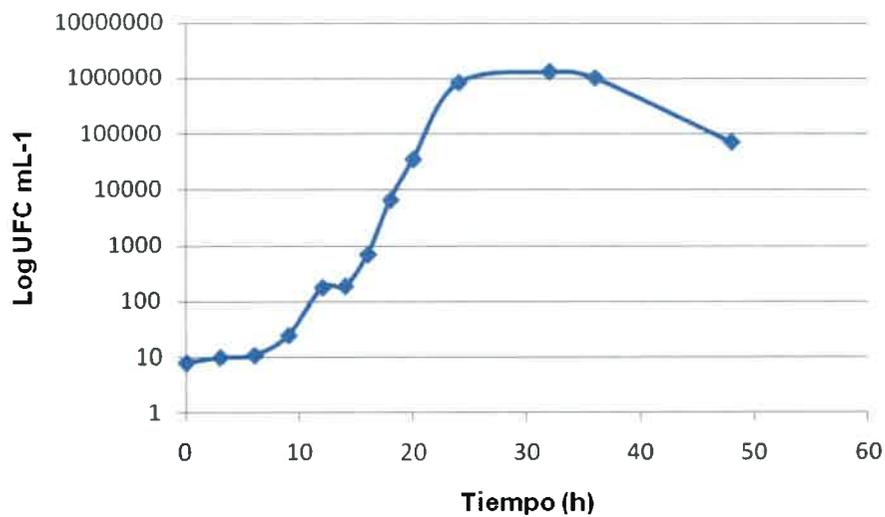


Figura 30. Curva de crecimiento (Log_{10} UFC mL⁻¹) de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 en medio con melaza en biorreactor durante 60 h a 28°C.

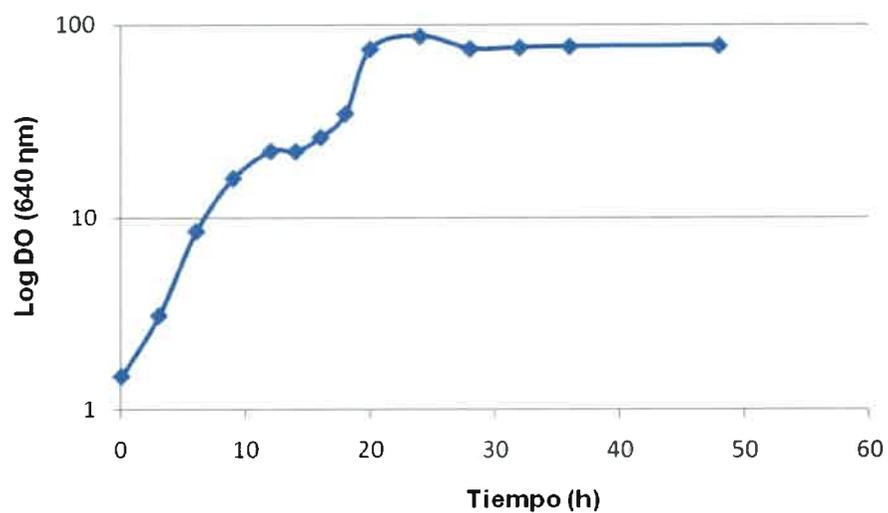


Figura 31. Curva de crecimiento (Log_{10} DO_{640nm}) de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 en medio con melaza en biorreactor durante 60 h a 28°C

Para determinar los parámetros cinéticos en las fermentaciones se aplicó la cinética de orden 1. Se tomó la fase exponencial de la hora 3 a la hora 12, posteriormente se graficó $\log \text{ UFC mL}^{-1}$ en función del tiempo (h) y en base a estos resultados se estableció la ecuación en el gráfico $Y = 1,808x - 0,608$ (Figura 32). En Tabla 42 se muestran los resultados de los parámetros cinéticos (μ_x y t_d).

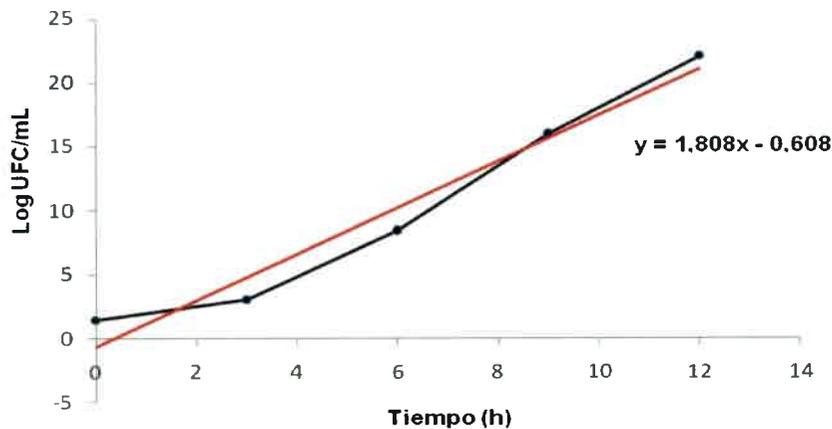


Figura 32. Velocidad específica de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en biorreactor. Medio Melaza 17% (p/v). Cepa RC016.

Tabla 43. Velocidad específica de crecimiento (μ_{\max}) y tiempo de duplicación (t_d) de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 en frascos agitados y en fermentador.

Condiciones de cultivo	Velocidad específica de crecimiento (μ_{\max})(h^{-1})	Tiempo de duplicación (t_d)(h)
Frascos en agitación	0,365	1,9
Biorreactor	1,80	0,38

$$\mu_{\max} = \frac{\ln x - \ln x_0}{t - t_0}$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Luego de haber escogido las condiciones del medio de cultivo en la cual se observó la mayor producción de biomasa de *S. cerevisiae* RC016, según los análisis estadísticos arrojados por las fermentaciones realizadas en Erlenmeyer, se llevaron a cabo las fermentaciones en biorreactor. Los resultados obtenidos del crecimiento de *S.*

cerevisiae RC016 a lo largo de la fermentación se observan en las Figuras 30 y 31, en donde se evidenciaron que la fase de latencia duró 7 h y su fase exponencial culminó luego de 24 h del proceso, observándose una DO máxima= 87,4. La levadura entró en fase estacionaria después de las 24 h hasta las 32 h.

Los resultados mejoraron notablemente en cuanto a la producción de biomasa y a los parámetros cinéticos considerados en este estudio, en donde se obtuvo una velocidad específica de crecimiento (μ_{\max}) 5 veces mayor y un tiempo de duplicación (t_d) 5 veces menor, comparado con los resultados obtenidos en las fermentaciones realizadas en los frascos del cultivo Erlenmeyer (Tabla 43).

Estos resultados indicaron que la biomasa de *S. cerevisiae* RC016 producida en biorreactor logró mejores resultados a lo largo de la fermentación. Los factores que influenciaron la mejor producción de biomasa en biorreactor fueron la agitación por turbina Rushton (lo cual proporcionó mayor homogenización al medio dando mayor transferencia de masa y oxígeno) y el monitoreo de pH en el rango que el cultivo experimentó durante la fermentación (4,0 a 5,0). El medio con melaza constituyó, por lo tanto, un sustrato ideal para la producción de *S. cerevisiae* RC016 en biorreactor. Estos resultados fueron semejantes a los obtenidos por Skontzou y col. (2003) quienes evidenciaron en su investigación que las condiciones de oxígeno suministradas en las fermentaciones realizadas en biorreactor y en medios ricos en azúcares como la melaza eran de vital importancia para la obtención de biomasa levaduriforme.

En las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* RC016 durante la fermentación en biorreactor (Fig 35 y 36) se exhibe una cinética de crecimiento de dos fases (diauxia) entre los tiempos 12 y 15, producida, presumiblemente, por la producción de etanol. Este resultado coincide con lo demostrado por Rojas y col. (2009) quienes postulan que la diauxia, conocida como el metabolismo de dos sustratos, es frecuentemente observada cuando dos o más fuentes de carbono son usadas en el mismo medio.

Para evitar el metabolismo fermentativo es necesario que la concentración de glucosa no supere 0,1-0,5 mg L⁻¹. Por encima de este umbral, aún en presencia de oxígeno, parte del azúcar se destina a la producción de etanol, fenómeno que se conoce como efecto *Crabtree*. Los elevados niveles de glucosa juegan un doble papel en este efecto. Por un lado, se genera una gran acumulación de piruvato intracelular a través

de la glucólisis, debido a la saturación de las actividades piruvato deshidrogenasa, acetaldehído deshidrogenasa y acetil CoA sintasa, favoreciendo su degradación vía piruvato descarboxilasa (Postma y col., 1989; Frick y Wittmann, 2005; González y col., 2005). Por otro, ejercen una represión tanto a nivel de expresión génica como de inactivación enzimática sobre los componentes del ciclo de Krebs y la cadena respiratoria (Aranda y col., 2002). Resultados comparables a los presentados en este trabajo fueron hallados por Otero-Rambla y col. (2009) quienes observaron que *S. cerevisiae* en medio con melaza de caña, presentó crecimiento diáuxico como consecuencia del consumo de etanol.

En este trabajo de tesis las fermentaciones se realizaron en condiciones de *batch* (cultivo discontinuo, todos los componentes se añaden desde el principio y no se renuevan) permitiendo que las células consuman el etanol producido. Las fermentaciones producidas en condiciones de *fed-batch*, favorecen el metabolismo respiratorio permitiendo obtener un gran rendimiento en biomasa, ya que la oxidación de la glucosa durante la respiración genera un rendimiento energético por mol de azúcar consumido mayor que el obtenido mediante el metabolismo fermentativo.

Conclusiones Parciales

Tomados en conjunto, los resultados muestran que, con el objetivo de desarrollar bioprocesos sostenibles para la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* con propiedades benéficas, adsorbente de micotoxinas y biocontroladores de crecimiento de hongos micotoxicogénicos, es necesario llevar a cabo un estudio detallado del comportamiento del microorganismo de interés en distintas condiciones de cultivo. De esta manera, y considerando la utilización de sustratos de bajo costo en procesos biotecnológicos, la producción *S. cerevisiae* RC016 a gran escala podría convertirse en un proceso sostenible. En este estudio las condiciones óptimas de producción son: *melaza 17% y extracto de levadura 4,61 g L⁻¹*. *En dichas condiciones, el modelo predice una respuesta máxima para la producción de biomasa de S. cerevisiae RC016.*

Conclusiones Finales

Conclusiones Finales

Levaduras *Saccharomyces cerevisiae* autóctonas del ecosistema de producción animal con propiedades benéficas son capaces de adsorber micotoxinas (AFB₁, ZEA, OTA) a diferentes concentraciones cuando las células son sometidas a las condiciones del tracto gastrointestinal.

Dichas levaduras son capaces de controlar, *in vitro*, el crecimiento y desarrollo de hongos micotoxicogénicos y de inhibir la producción de AFB₁ por *Aspergillus parasiticus*; OTA por *Aspergillus carbonarius* y ZEA por *Fusarium graminearum* en variadas condiciones ambientales, lo que sugiere que las levaduras presentes estarían cumpliendo un rol ecológico en el ensilaje y alimento destinado a la producción animal, constituyendo un agente potencial de detoxificación.

La levadura *S. cerevisiae* RC016 demostró ser promisoría para su uso como adsorbente de micotoxinas por su alto porcentaje de reducción de AFB₁, ZEA y OTA en condiciones gastrointestinales simuladas y por poseer una alta relación engrosamiento de pared celular/tamaño de célula; por inhibir el crecimiento de *F. graminearum*, *A. carbonarius* y *A. parasiticus* y reducir la producción de AFB₁, OTA y ZEA en condiciones fisiológicas del almacenamiento de los alimentos de producción animal.

Una mejora general en la producción de biomasa de *S. cerevisiae* RC016 se logró como resultado de la optimización del medio de cultivo para la producción de biomasa mediante un diseño estadístico. Estos resultados indican la importancia del diseño adecuado de las condiciones de cultivo para lograr un aditivo alimentario que sea benéfico a nivel de sanidad animal y rentable en términos económicos.

Perspectivas futuras

PERSPECTIVAS FUTURAS

Las cepas de levaduras nativas del ecosistema animal han demostrado ser excelentes decontaminantes de micotoxinas. En este trabajo se postula la adsorción como mecanismo predominante de remoción de las micotoxinas, sin embargo futuros ensayos deberían enfocarse en estudiar procesos de degradación a fin de determinar la posterior liberación de metabolitos derivados de las micotoxinas. Estudios de resonancia magnética nuclear permitirían comprender la naturaleza química de los procesos involucrado/s en la remoción de estas micotoxinas. Estos estudios serían necesarios para completar y apoyar de manera significativa los avances en la nutrición animal aplicada para ampliar nuestra comprensión del papel beneficioso de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* en la descontaminación de micotoxinas en los alimentos y la disminución de la biodisponibilidad de las micotoxinas en el TGI de los animales de producción.

En este trabajo se realizó la optimización sistemática y estadística del medio utilizado para la fermentación de la cepa RC016, en estudios posteriores se deberían realizar ensayos de adsorción de micotoxinas con esta levadura luego del proceso de fermentación para confirmar que la cepa mantiene la propiedad de detoxificación y realizar fermentaciones en condiciones de *fed-batch* a fin de lograr una mayor producción de biomasa de la cepa.

Aunque se sabe que ciertos probióticos tienen efectos beneficiosos son poco conocidos los mecanismos moleculares de los beneficios notificados. Esos mecanismos pueden variar de un probiótico a otro (para obtener el mismo beneficio por diferentes medios) y pueden consistir en una combinación de eventos, haciendo con ello que esta sea una esfera muy problemática y compleja. Tales mecanismos pueden estar relacionados con la producción de uno o varios metabolitos o enzimas específicos que actúan directamente sobre uno o más microorganismos. En la sección I se demostró que cepas de *S. cerevisiae* fueron capaces de inhibir el desarrollo de bacterias enteropatógenas a través de sustancias antimicrobianas, en futuros trabajos deberían analizarse mayor número de cepas y la naturaleza de dicha sustancia además de incluirse ensayos donde se verifique la propiedad de modulación del sistema inmunológico del huésped y realizar pruebas de toxicidad en las cepas de levaduras para confirmar su inocuidad.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Abarca ML, Accensi F, Bragulat MR y Cabañes FJ. (2001). Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *Journal of Food Protection*. **64**: 903-906.
- Abarca ML, Bragulat MR, Castellá G y Cabañes FJ. (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**: 2650-2652.
- Acevedo, M. y Pedroso, M. (1999). Respuesta humoral en ratones ante la Administración oral del β -1-3- glucano particulado. *Rev Salud Animal* **21**:91-96.
- Agarwal, N.; Kamra, D.; Chaudhary, L.; Sahoo, A. y Pathak, N. (2000). Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains for use as a microbial feed additive. *Letters in Applied Microbiology*, **31**:270-273
- Aguilar-Uscanga, B. y François, J. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology*. **37**: 268-274.
- Alander, M.; Korpela, R.; Saxelin, M.; Vilpponen Salmela, T.; Mattila-Sandholm, T. y von Wright, A. (1997). Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. *Letters in Applied Microbiology*. **24**: 361-364.
- Alander, M.; Satokari, R.; Korpela, R.; Saxelin, M.; Vilpponen Salmela, T.; Mattila Sandholm, T. y von Wright, A. (1999). Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 351-354.
- Alonso, V; Monge, M.; Larriestra, A.; Dalcerro, A.; Cavaglieri, L.; Chiacchiera, S. (2010). Naturally occurring aflatoxin M1 in raw bulk milk from farm cooling tanks in Argentina. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* **27**: 373-379.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**: 403-410.
- Amer, A. C. (2005). Aflatoxin contamination of developing corn kernels. *Commun Agric Appl Biol Sci.* **70**: 281-93.
- Aranda, A., Querol, A. y Del Olmo, M., (2002). Correlation between acetaldehyde and ethanol resistance and expression of HSP genes in yeast strains isolated during the biological aging of sherry wines. *Arch. Microbiol.* **177**: 304–312.
- Aravind, K.L.; Patil, V.S.; Devegowda, G.; Umakantha, B. y Ganpule S.P. (2003). Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. *Poult. Sci.* **82**: 571-576.

- Armando, R.; Dogi, C.; Pizzolitto, R.; Escobar, F.; Peirano, S.; Salvano, M.; Sabini, L.; Combina, M; Dalcerro, A. y Cavaglieri, L (2011). *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environment with *in vitro* aflatoxin B₁ binding ability and anti-pathogenic bacterial influence. *World Mycotoxin Journal*. **4**: 59-68.
- Armas, A. y Chicco, Y. (2000). Comparación del maíz, trigo, arroz y sorgo en raciones para pollos de engorde. *Agron Trop*. **20**: 457-462.
- Aysan, Y., Karatas, A. y Cinar, O. (2003). Biological control of bacterial stem rot caused by *Erwinia chrysanthemi* on tomato. *Crop Protect*. **22**: 807-811
- Bacon, C.; Yates, I.; Hinton, D. y Meredith, I. (2001). Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environ Health Perspect*. **109**: 325-332.
- Bauer, J.; Garies, M. (1987). Ochratoxin A in the food chain. *J. Vet. Med.*, **34**:613-627 (in German).
- Barberis, C.L., Astoreca, A.L., Dalcerro, A.M.y Magnoli, C.E., (2010). Food-grade antioxidants and antimicrobials to control growth and ochratoxin a production by *Aspergillus section Nigri* on peanut kernels. *Food Prot.*; **73**: 1493-501
- Bejaoui, H.; Mathieu, F.; Taillandier, P.; Lebrihi, A., (2004). Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology*, **97**: 1038-1044.
- Beltzer, M.P. (2003). Estudios de *Byssoschlamys nivea* en ensilados de alfalfa potencialidad de los mismos para la producción de patulina en microsilos experimentales. Tesis Doctoral. U.N.L., Argentina
- Beretta B, Gaiaschi A, Gailli CL, Restani P., (2000). Patulin in apple-based foods: occurrence and safety evaluation. *Food Additives and Contaminants*. **17**: 399-406.
- Bhat, R.V., (1988). Mould deterioration of agricultural commodities during transit: Problems faced by developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, **72**: 219-225
- Binder, E.M.; Tan, L.M.; Chin, L.J.; Handl, J. y Richard, J. (2007). Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology*, **137**: 265-282.
- Blanco, M. (1999). *Aspergillus*. *Rev Salud*. **328**:1-4.
- Bleve, G.; Grieco, F, Cozzi, G.; Logrieco, A. y Visconti, A. (2006). Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *Int J Food Microbiol*, **108**: 204-9.
- Bontempo, V.; Di Giancamillo, A.; Savoini, G.; Dell'Orto, V. y Domeneghini, C. (2006). Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morpho-functional aspects and growth in weaning piglets. *Anim. Feed Sci. Technol*. **129**: 224-236.

- Bolognani, F.; Rumney, C.J. y Rowland, R., (1997). Influence of carcinogen binding by lactic acid producing bacteria on tissue distribution and in vivo mutagenicity of dietary carcinogens. *Food Chem. Toxicol.* **35**: 535-545.
- Boris, S.; Suárez, J.; Vázquez, F. y Barbés, C. (1998). Adherence of human *Lactobacilli* to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infect. Immunol.* **66**: 1985-1989.
- Boutrif E y Canet C. (1998). Mycotoxin prevention and control FAO programmes. *Revuede Medicina Veterinária.* **149**: 681-684.
- Box, G. E. P. y Wilson, K. (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *J. Roy. Stat. Soc. B* **13**:1-45.
- Bueno, D.J.; Casale, C.H.; Pizzolitto, R.P.; Salvano, M.A. y Oliver, G. (2007). Physical adsorption of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: a theoretical model. *J. Food Prot.* **70**: 2148-2154.
- Bullerman, L. y Bianchini, A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing. *Int J Food Microbiol.* **119**:140-146.
- Bui, K. y Galzy, P. (1990). In Yeast Technology (Eds, Spencer, J. F. T. & Spencer, D. M.) Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 407.
- Cajo, L.; Nizama, L. y Carreño, C. (2009). Efecto de la concentración del inóculo y la melaza como suplemento de la vinaza de destilería para la producción de biomasa de *Candida utilis* native. *Scientia Agropecuaria*, **2**: 65-72.
- Caridi, A. (2006). Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie van Leeuwenhoek* **89**:417-422.
- Carvalho, A.S.; Silva, J.; Ho, P.; Teixeira, P., Xavier Malcata, F. y Gibas, P. (2004). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *Int Dairy J.*; **14**: 835-847.
- Cavaglieri L., A. Passone y Etcheverry, M. (2004)b. Screening procedures to select rhizobacteria with biocontrol activity on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B₁ production. *Res. Microbiol.* **155**:747-754.
- CAST (2003). Mycotoxins. Risks in plant, animal, and human systems. Ames, Iowa.: Council for Agricultural Science and Technology. (Task Force Report 139). ISBN
- Cecchini, F.; Morassut, M.; Moruno, E.G. y Di Stefano, R. (2006). Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiol.* **23**:411-417.
- Çelik T, Sarimehmetolu B, Küplülü Ö. (2005). Aflatoxin M₁ contamination in pasteurized milk. *Vet Arhiv* **75**: 57-65.

- Cerveró, M.C.; Castillo, M.A; Montes, R. y Hernández, E. (2007). Determination of trichothecenes, zearalenone and zearalenols in commercially available corn-based foods in Spain. *Rev Iberoam Micol*; **24**: 52-55.
- Charmley, L.L. y Trenholm, H.L. (2011). Canadian Food Inspection Agency. Fact Sheet – Mycotoxins [en línea]. [Consultado: 19 de mayo de 2011]. Disponible en Internet: <http://www.inspection.gc.ca/english/animafeebet/pol/mycoe.shtml>.
- Charteris, W.P.; Kelly, P.M.; Morelli, L. y Collins, J.K. (1997). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*. **84**: 759-768.
- Chowdhury, S.R. y Smith, T.K. (2004). Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on performance and metabolism of laying hens. *Poultry Science*, **83**: 1849-1856
- Cicoňová, P.; Laclaková, A. y Máté, D. (2010). Prevention of Ochratoxin A Contamination of Food and Ochratoxin A Detoxification by Microorganisms – A Review. *Czech J. Food Sci.* **28**: 465-474.
- Collado, M.C.; Meriluoto, J. y Salminen, S. (2007). Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: In vitro evaluation of different methods. *J. Microbiol. Methods*. (doi:10.1016/j.mimet.2007.07.005).
- Colleen, Y. y David, G. (1999). Influence of Kernel Age on Fumonisin B₁ Production in Maize by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol.* **65**: 2853-2856.
- Cotty, P. y García, R. (2007). Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *Int J Food Microbiol.* **119**:109-115.
- COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales). (1983). Alimentos completos para aves. Norma N°1881. FONDONORMA. Caracas.
- Czerucka, D.; Piche, T. y Rampal, P. (2007). Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, **26**: 767-778.
- Dalceró, A.; Magnoli, C.; Chiacchiera, S.; Palacios, G. y Reinos, M. (1997). Mycoflora and incidence of aflatoxin B₁, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. *Mycopathol.* **141**: 37-43.
- Dahiya, N.; Tewari, R y Hoondal, G.S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**: 773-782
- Dawson, K.A. (1993). Current and future role of yeast culture in animal production: a review of research over the last seven years. The biotechnology in the feed industry, 9. New York 1993. Proceedings. New York: ABFI. P. 21.

- Degre, R. (1993). Selection and Commercial Cultivation of Wine Yeast and Bacteria. In Wine Microbiology and Biotechnology. Fleet, G.H. (ed). Harwood Academic Publishers. 421-447.
- De Hoog GS, Guarro J, Gené J y Figueras MJ. (2000). Atlas of Clinical Fungi, 2nd edn. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Del Re, B.; Sgorbati, B.; Miglioli, M. y Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**: 438-442.
- Díaz, A.; Florez, J. y Cotes, A. (2005). Optimización de un medio de cultivo para la producción de la levadura *Pichia onychis* (Lv 027). *Revista Colombiana de Biotecnología*, **7**: 51-58.
- Díaz, G. (2005). Micotoxinas y micotoxicosis de importancia en salud humana en Colombia. Memorias IX Congreso Nacional de Avicultura. Federación Nacional de Avicultura. Caracas, Mayo 11 – 14. CD Rom.
- Donohue, D.C. y Salminen, S. (1996). Safety assessment of probiotic bacteria. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **5**: 25-28.
- Dos Santos VM, Dorner JW y Carreira F. (2003) Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage. *Mycopathologia*. **156**: 133-138.
- Draksler, D.; Gonzáles, S. y Oliver, G. (2004). Preliminary assays for the development of a probiotic for goats. *Reprod. Nutr. Development*, **44**: 397-405.
- Dutta, T. y Dass, P. (2001). Isolation of aflatoxigenic strain of *Aspergillus* and detection of aflatoxin B₁ from feed in India. *Mycopathol.* **151**: 29-33.
- Duvick, J. (2001). Prospects for reducing Fumonisin contamination of maize through genetic modification. *Environ Health perspect.* **109**: 337-342.
- EEC 70/524 (2004). Update (Situation as 30 April 2004) of the list of the authorized additives in feedingstuffs published in application of Article 9t (b) of Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs. http://www.awt-feedadditives.de/fileadmin/awt/pdf/EU-FEED_ADDITIVE_REGISTER_Part_2_22-07-2004.pdf . Acceded Aug. 2006
- EI-Ghaouth, A.; Wilson, CL. y Wisniewski, M. (2003). Control of Postharvest Decay of Apple Fruit with *Candida saitoana* and Induction of Defense Responses. *Phytopathology*, **93**: 344-8.
- EI-Nezami, H.; Salminen, S.; Ahokas, J. y Kannkaanpää, P. (1998). Ability of strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, Aflatoxin B₁. *Food Chem. Toxicol.* **36**: 321-326.

- El-Nezami, H.; Chrevatidis, A.; Auriola, S.; Salminen, S. y Mykkanen, H. (2002). Removal of common *Fusarium* toxins *in vitro* by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Additives and Contaminants*, **19**: 680-686.
- Esteve-Zaroso, B.; Belloch, C.; Uruburu, F. y Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bact.*, **49**: 329-337.
- Fajardo-Castillo, E. y Sarmiento Forero, S. (2007). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- FAO/WHO (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder milk and Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report.
- Ferket PR. (2004). Alternatives to antibiotics in poultry production: responses, practical experience and recommendations. In: Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. Proceedings of Alltech's 20th Annual Symposium (Eds. TP Lyons and KA Jacques). Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp 57-67.
- Fernández, M.F., Boris, S. y Barbés, C. (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract *Journal of Applied Microbiology*, **94**: 449-455.
- Filonow, A.B., Vishniac, H.S. y Anderson J.A. y Janisiewicz, W.J. (1996). Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. *Biol. Control* **7**: 212-220.
- Fraga, M.E.; Curvello, F.; Gatti, M.J.; Cavaglieri, L.R.; Dalcero, A.M. y Rosa, C.A.R., (2007). Potential aflatoxin and ochratoxin A production by *Aspergillus* species in poultry feed processing. *Vet. Res. Comm.* **31**: 343-53.
- Frances, J.; Bonaterra, A.; Moreno, M. C.; Cabrefiga, J.; Badosa, E. y Montesinos, E., (2006). Pathogens aggressiveness and postharvest biocontrol efficiency in *Pantoea agglomerans*. *Postharvest Biology and Technology* **39**: 299-307.
- Freire FC, Kozakiewicz Z y Paterson RR. (1999). Mycoflora and mycotoxins of Brazilian cashew kernels. *Mycopathologia*. **145**: 95-103.
- Frick, O. y Wittmann, C. 2005. Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ¹³C flux analysis. *Microb. Cell Fact.* **4**: 30.
- Frisvad JC y Samson RA. (1991). Mycotoxins produced by species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. En: Cereal grain, mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Chelkowski J. (ed.). Developments in Food Science, Elsevier, Amsterdam. 441-476

- Frisvad JC, Skouboe P, Samson RA. (2005). Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B₁, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*. 28: 442–453.
- Fuller, R., ed. (1992) Probiotics. The Scientific Basis. Chapman & Hall, London, U.K. 398 p.
- Gadd, J. (2005). The likely pay back on preventing mycotoxins. *Pig Progress*, 21:19.
- Gallardo, M. (2007). El valor de los alimentos. Available online: http://www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/nutricion/nutricion_valordealimentos.htm
- Galtier, P. (1978). Contribution of pharmacokinetic studies to mycotoxicology – Ochratoxin A. *Veterinary Science Communications*, 1:349-358.
- Garibay Torres, L. (2007). Suplementación de beta-glucanos purificados en las dietas para el pollo de engorde, sobre los parámetros productivos. Universidad de Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina y Zootecnia. Tipo de referencia: Tesis.
- Gasser, F. (1994). Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bull. Inst. Pasteur*. 92: 45-67.
- Gedek, B.R. (1999). Adherence of *Escherichia coli* serogroup o157 and the *Salmonella Typhimurium* mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii* Mycoses. 42: 261–264. Doi:10.1046/j.1439-0507.1999.00449.x.
- Gentles A, Smith EE, Kubena LF, Duffus E, Johnson P, Thompson J, Harvey RB y Edrington TS. (1999). Toxicological evaluations of cyclopiazonic acid and ochratoxin A in broilers. *Poultry Science*. 78:1380-1384.
- Gimeno, A. y Martins, M.L. (2003). Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos. Special nutrients, INC. Talleres gráficos D.E.L S.R.L Buenos Aires.
- Goffeau, A.; Barrell, B.G.; Bussey, H.; Davis, R.W.; Dujon, B. y Feldman, H. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274: 563-567.
- González, N. (1990). Alimentación animal. Editorial América, C.A. Venezuela.
- González Pereyra, M.L.; Pereyra, C.M.; Ramirez, M.L.; Rosa, C.A.R.; Dalcero, A.M.; Cavaglieri, L.R. (2008). Determination of mycobiota and mycotoxins in pig feed in central Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 46: 55-561.
- González Pereyra, M.L.; Keller, K.M.; Keller, L.A.M.; Cavaglieri, L.R.; Queiroz, B.; Tissera, J.; Dalcero, A.M.; Magnoli, C., Rosa, C.A.R. (2009). Mycobiota and mycotoxins of equine feedstuffs in the central region of Argentina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 31: 24-29.

- González Pereyra, M.L.; Rosa, C.A.R.; Dalcerro, A.M. y Cavaglieri, L.R. (2011). Mycobiota and mycotoxins in malted barley and brewer's spent grain from Argentinean breweries. *Lett Appl Microbiol.* **53**: 649-55.
- Gourama H. y Bullerman L.B. (1995). *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic Fungi of Concern in Foods and Feeds: A review. *Journal of Food Protection.* **58**: 1395-1404.
- Gqaleni, N.; Smith, E.; Lacey, L. y Gettinby, G. (1997). Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. *Appl Environ Microbiol.* **63**: 1048-1053.
- Granchi, L.; Bosco, M.; Messini, A. y Vicenzini, M. (1999). Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rRNA ITS region. *J. Appl. Microbiol.*, **87**: 949-956.
- Grant, P.G. y Phillips, T.D. (1998). Isothermal adsorption of aflatoxin B₁ on HSCAS clay. *J. Agric. Food Chem.*, **46**:599-605.
- Grunkemeier, A. (1990). Untersuchungen zur Beeinflussung der Rückstandsbildung von Ochratoxin A beim Schwein durch den diätetischen Einsatz von Adsorbentien. PhD thesis, University of Munich, Germany.
- Gusils, C.; Bujazha, M. y González, S. (2002). Preliminary studies to design a probiotic for use in swine feed. *Interciencia*, **27**: 409-413.
- Haddad, S.G. y Goussous, S.N. (2005). Effect of yeast culture supplementation on nutrient intake, digestibility and growth performance of Awassi Lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **118**: 343-348.
- Hamilton, M. (1996). Probiotic remedies are not what they seem. *British Medical Journal*; **312**: 55-56.
- Hashem, A. (1990). Fungal flora of barley seed in Saudi Arabia and its control. *J Food Prot.* **53**: 786-789.
- Haskard, C.H.; El-Nezami, H.; Kankaanpaa, P.; Salminen, S. y Ahokas, J. (2001). Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3086-3091.
- Havenaar, R.; Ten Brink, B. y Huis in't Veld, J.H.J. (1992). Selection of strains for probiotic use. The Scientific Basis. Chapman & Hall, London. 209 – 221.
- Hayes, P. (1993). Microbiología e higiene de los alimentos. Editorial Acribia, España.
- Hernández-Mendoza, H.S.; Garcia, J.L. y Steele. (2009). Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B₁. *Food and Chemical Toxicology*, **47**:1064-1068

- Hua, S.-S. T., Baker, J. L. y Flores-Espiritu, M. (1999). Interactions of saprophytic yeasts with a nor mutant of *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2738-2740.
- Huang SJ, Huang LC y Chen CC. (1999). Antioxidant properties of *Agaricus blazei*. World Society for Mushroom Biology and Mushroom Products. Pp.10. <http://www.worldmushroomsociety.com/research/rlist.asp?so=writer&sk=ShihJeng%20Huang>
- Hussein, H.S., Mackie, R.I., Merchen, N.R., Baker, D.H. y Parsonsy, C.M. (1996). Effects of oleaginous yeast on growth performance, fatty acid composition of muscles, and energy utilization by poultry. *Bioresource Technology* **55**: 125-130.
- Huwig, A.; Freimund, S.; Käppeli, O. y Dutler, H. (2001). Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol. Letters.* **122**: 179-188.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). Toxins Derived from *Fusarium moniliforme*: Fumonisin B1 and B2 and Fusarin C (Group 2B), Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC: Lyon, (1993); vol. 56, pp. 445.
- Jacobsen, C.; Rosenfeldt, V.; Hayford, A.; Moller, P.; Michaelsen, K.; Paerregaard, A.; Sandstro, B.; Tvede, M. y Jakobsen, M. (1999). Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of *Lactobacillus* spp. by *In Vitro* Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans. *Applied and Environmental Microbiology*, **16**: 4949-4956.
- Jand, S.K.; Singh, P.P.; Singh, A. (1995). Observations on occurrence of poultry diseases associated with mycotoxins in feed. *Ind. J. Anim. Sci.* **65**: 1063-1067
- Janisiewicz, W. J. y Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology* **40**:411-441.
- Jankovic, I.; Ventura, M.; Meylan, V.; Rouvet, M.; Elli, M. y Zink, R. (2003). Contribution of aggregation-promoting factor to maintenance of cell shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2. *J. Bacteriol.*, **185**: 3288-3296.
- Jelinek, C.F.; Ponland, A.E. y Wood, G.E. (1989). World wide occurrence of mycotoxins in foods and feeds, an update. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **72**: 223-230.
- Jorgensen, K. (1998). Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Addit. Contam.*, **15**: 550-554.
- Karaman, M.; Basmacioglu, H.; Ortatagli, M. ; Oguz, H. (2005). Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology. *British Poultry Science*, **46**: 394-400.
- Kamphuis, H.; Van der Horst, M. y Samson, R.; Rombouts, F. y Notermans, S. (1992). Mycological condition of maize products. *Inter J food Microbiol.* **16**: 237-240.

- Keller, K.M.; Queiroz, B.D.; Keller, L.A.M.; Ribeiro, J.M.M.; Cavaglieri, L.R.; González P, M.L.; Dalcero, A.M.; Rosa, C.A.R. (2007). The mycobiota and toxicity of equine feed. *Vet. Res. Comm.*, **31**: 1037-1045.
- Kennedy, M., y D. Krouse (1999). Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 456-475.
- Kim, M.D.; Rhee, S.K. y Seo, J.H. (2001). Enhanced production of anticoagulant hirudin in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* by chromosomal d-integration. *J Biotech*, **85**: 41-48.
- Kirk PM, Cannon PF, David JC y Stalpers JA. (2001). Dictionary of the Fungi. 9th edn. Wallingford, UK: CAB International
- Klaenhammer, T.R. y Kullen, M.J. (1999). Selection and desing of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, **50**: 45-47.
- Klich, M.A. y Pitt, J.I. (1988). Laboratory guide to commom *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO, Division of Food Research Sydney. Academic Press. Australia
- Klis, F. (1994). Review: Cell wall assembly in yeast. *Yeast*. **10**: 851-869.
- Klis, F.M.; Boorsma, A. y De Groot, P., (2006). Review: Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **23**:185-202.
- Kollar, R.; Reinhold, B.B.; Petrakova, E.; Yeh, H.J.C; Ashwell, G.; Drgonova, J., Kapteyn, J.C.; Klis, F.M. y Cabib, E. (1997). Architecture of the yeast cell wall: β (1,3) glucan and chitin. *Journal of Biology and Chemistry*. **272**:17766-17775.
- Kos, B.; Suskovic, J.; Vukovic, S.; Simpraga, M.; Frece, J. y Matosic, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* **94**: 981-987.
- Kotowski, K.; KostECKI, M.; Grabarkiewicz-Szczesna, J.y Golinski, P. (1993). Ochratoxin A residue in kidneys and blood of pigs. *Med. Weteryn.*, **49**: 554-556.
- Krogh, P. (1976). Mycotoxic nephropathy. In *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. Academic Press: New York, **20**: 147-170.
- Kuiper-Goodman, T. y Scott, P.M. (1989). Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin. A. *Biomed. Environ. Sci.*, **2**:179-248.
- Kühle, A.; Skovgaard, K.y Jespersen, L. (2005). *In vitro* screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology*. **101**: 29-39.
- Kumura, H.; Tanoue, Y.; Tsukahara, M.; Tanaka, T. y Shimazaki, K. (2004). Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *Am. Dairy Sci. Ass.*, **87**: 4050-4056.

- Kurtz, H. J. y Mirocha, C. J. (1978). Zearalenone (F2) induced estrogenic syndrome in swine. Pp. 1256–1264. In T. D. Wyllie and L. G. Morehouse (Eds.). *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses*. Vol. 2. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Lacey J. (1991). Natural occurrence of mycotoxins in growing and conserved forage crops. pp. 363-397. en: Smith JE, Henderson RS, eds. *Mycotoxins and Animal Foods*.
- Langeris, W.H.; Kulandai, J.; Gilbert, R.W. y Smith, C.G. (1997). Production of beta-glucan-mannan preparations by autolysis of cells under certain pH, temperature and time conditions. Patente W9702356. Datos proporcionados por la base de datos de esp .cenet.test-12.
- Lahtinen, S.J.; Haskard, C.A.; Gratz, S.; Puong, K.Y.; Salminen, S. y Mykkanen, H., (2003). Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B₁ by viable and nonviable bacteria. *J. Food Prot.*, **66**: 426-430.
- Lawlor, P.G. y Lynch, P.B. (2001). Peer review **54**: 117-120.
- Lázaro, C; Carcelén, D.; Marlon, F.; Torres, M.A. y Ara, M.G. (2005). Efecto de probióticos en el alimento de marranas sobre los parámetros productivos de lechones. *Rev. investig. vet. Perú*, **16**: 2.
- Leslie JF y Summerell BA. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Ames, IA: Blackwell Publishing.
- Lee, H.B. y Magan, N. (1999). Environment factors influence in vitro interspecific interactions between *A. ochraceus* and other maize spoilage fungi, growth and ochratoxin production. *Mycopathologia*, **146**:43–47.
- Lee, Y. K.; Salminen, S. (1995). The coming age of probiotics. *Trends in Food Sciences and Technology*, **6**: 241-5.
- Lee, Y.; Lim, C.; Teng, W.; Ouwehand, A.; Tuomola, E. y Salminen, S. (2000). Quantitative Approach in the Study of Adhesion of Lactic Acid Bacteria to Intestinal Cells and Their Competition with Enterobacteria. *Appl Env Microbiol*, **66**: 3692-3697.
- Lee, Y.K.; El-Nezami, H.; Haskard, C.A.; Gratz, S.; Puong, K.Y.; Salminen, S. y Mykkänen, H. (2003). Kinetics of Adsorption and Desorption of Aflatoxin B₁ by Viable and Nonviable Bacteria. *Journal of Food Protection*, **66**: 426-430.
- Leman, A.; Straw, B.; Mengeling, W.; D'allaire, S. y Taylor, D. (1992). *Disease of swine*. (7th ed). Iowa State university. Iowa, U.S.A.
- Leroy, F. y Vuyst, L. (2002). Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZS C5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase. *Int. J. Food Microbiol.* **72**: 155-164.

- Lin, W.H.; Yub, B.; Jangc, H.S.; Tsen, H.Y. (2007). Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe*, **13**: 107-113.
- Line, J.E; Bailey, J.S.; Cox, A.N. y Stern, J.N. (1997). Yeast treatment to reduce *Salmonella* and *Campylobacter* populations associated with broiler chickens subjected to transport stress. *Poult. Sci.* **76**: 1227-1231.
- Liu, Z.; Jiang, Z.; Zhou, K.; Li, P.; Liu, G. y Zhang, B. (2007). Screening of *Bifidobacteria* with acquired tolerance to human gastrointestinal tract. *Anaerobe*. Doi: 10.1016/j.anaerobe.2007.05.002.
- Luo, Y.; Yoshizawa, T. y Katayama, T. (1990). Comparative study on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in corn and wheat from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 3723-3726.
- Magan, N. y Lacey, J. (1984). Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, **82**: 83-93.
- Magnoli, A.P.; Cavaglieri, L.; Magnoli, C.; Monge, J.C.; Miazzo, R.; Peralta, M.F.; Salvano, M.; Rosa C.A.R.; Dalcero, A.; Chiacchiera, S. (2008). Bentonite performance on broiler chickens fed with diets containing natural levels of aflatoxin B₁. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, **30**: 55-60.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D. y Polonelli, L. (1997). Yeast killer systems. *Clinical Microbiology Reviews*, **10**: 369-400.
- Magnoli C, Chiacchiera SM, Miazzo R, Palacio G, Angeletti A, Hallak C y Dalcero A. (2002). The mycoflora and toxicity of feedstuffs from a production plant in Cordoba, Argentina. *Mycotoxin Research*. **18**: 7-22.
- Magnoli, C.; Dalcero, A.; Chiacchiera, S.; Miazzo, R. y Saenz, M. (1998). Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. *Mycopathol*, **142**: 27-32.
- Mahmoud, A. (1993). Toxicogenic fungi and mycotoxin content in poultry feedstuff ingredients. *J Basic Microbiol.* **33**: 101-104.
- Mphande, F.; Siame, B. y Taylor, J., 2004. Fungi, aflatoxins, and cyclopiazonic acid associated with peanut retailing in Botswana. *J. Food. Prot.* **67**:96-102.
- Martín, T.; Rocha, M.; Rosas, E.; Lopez, S. y Corrales, C. (2002). Efectos de extractos alcohólicos de plantas silvestre sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniloforme*, y *Fusarium poae*. *Rev Iberoam Micol*, **19**: 84-88.

- Marin, S.; Sanchis, V.; Ramos, A.; Vinas, I; y Magan, N. (1998). Environment factors in vitro interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research*, **102** :831-837.
- Marin, D.; Taranu, I.; Bunaciu, R.; Pascale, F.; Tudor, D.; Avram, N.; Sarca, M.; Cureu, I.; Criste, R.; Suta, B. y Oswald, P. (2002). Changes in performance, blood parameters, humoral and cellular immune responses in weaning piglets exposed to low doses of aflatoxin. *J. Anim. Sci.* **80**: 1250-1257.
- Marrero, Y.; Galindo, J.; Alvarez, E.; Torres, V.; Aldama, A.; Bocourt, R.; Elías, A. y Delgado, D. (2005). Metodología para aislamiento y caracterización de levaduras provenientes del ecosistema ruminal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, **39**: 47-52.
- Marquardt, R.R. y Frolich, A.A. (1992). A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J Anim Sci*, **70**: 3968-3988.
- Marteau, P.; Pochart, P; Bouhnik, Y.y Rambaud, J. C. (1993). Fate and effects of some transiting microorganisms in the human gastrointestinal tract. *World Rev. Nutr. Diet.* **74**: 1-21.
- Marteau, P.; Minekus, M.; Havennar, R.; Huis in't Veld, J. (1997). Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and effects of bile. *J. Dairy Sci.* **80**: 1031-1037.
- Martins ML y Martins HM. (1999). Natural and in vitro coproduction of cyclopiazonic acid and aflatoxins. *Journal of Food Protection.* **3**:292-294.
- Mastromarino, P.; Brigidi, P.; Macchia, S.; Maggi, L.; Pirovano, F.; Trinchieri, V.; Conte, U. y Matteuzzi, D. (2002). Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets. *J. Appl. Microbiol.* **93**: 884-893.
- Mathew, A. G., S. E. Chattin, C. M. Robbins y D. A. Golden. (1998). Effects of a direct-fed yeast culture on enteric microbial populations, fermentation acids, and performance of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* **76**: 2138-2145.
- McCullough, M.J, Clemons, K.V, McCusker, J.H, y Stevens, D.A. (1998). Species Identification and Virulence Attributes of *Saccharomyces boulardii* (nom. inval.). *J Clin Microbiol*, **36**: 2613-2617.
- Miller, J.D. (1994). Epidemiology of *Fusarium* ear diseases of cereals. Pp. 19–36. In J. D. Miller y H. L. Trenholm (Eds.). *Mycotoxins in Grain: Compounds Other than Aflatoxin*. Eagan Press, St. Paul, Minnesota.
- Miller, D. (2001). Factors that affect the occurrence of fumonisin. *Environ Health Perspect.* **109**: 321-324

- Monaci L y Palmisano F. (2004). Determination of ochratoxin A in foods: state-of-the-art and analytical challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **378**: 96-103.
- Montgomery, D. C. (2001). Design and analysis of experiments. Marcel Dekker, New York.
- Moss MO. (1991). Mycology of cereal grain and cereal products. En: Cereal grain. Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and storage. Chelkowski J., (ed.). Elsevier, Amsterdam.
- Moss MO. (1996). Mode of formation of ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*. **13**: 5-9.
- Mourad, K. y Nour-Eddine, K. (2006). *In vitro* preselection criteria for probiotic *Lactobacillus plantarum* strains of fermented olives origin. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*. **1**: 27- 32.
- Mphande, F.; Siame, B. y Taylor, J. (2004). Fungi, aflatoxins, and cyclopiazonic acid associated with peanut retailing in Botswana. *J. Food. Prot.* **67**: 96-102.
- Murthy, T.N. y Devegowda G. (2004). Efficacy of modified glucomannan Mycosorb to adsorb aflatoxin B₁ in gut conditions of broiler chickens. Compact disk in XXII World's Poultry Congress, The World's Poultry Science Association WPSA, Istanbul Turkey
- Nelson, P.E.; Plattner, R.D.; Shackelford, D.D.; Desjardins, A.E. (1992). Fumonisin B₁ production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in Section Liseola a by some related species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 984-989.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. y Marasas, W.F.O. (1983). *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. University Park, PA: The Pennsylvania State University Press.
- Nesci, A.; Rodriguez, M.y Etcheverry, M. (2003). Control of *Aspergillus* growth and aflatoxin production using antioxidants at different conditions of water activity and pH. *J Appl Microbiol.* **95**: 279-87.
- Newbold, C.J; Wallace, R.J. y McIntosh, F.M. (1996). Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *British Journal of Nutrition* , **76**: 249-261.
- Niderkorn, V.; Boudra, H.; Morgavi; D.P. (2006). Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria in vitro. *J. Appl. Microbiol.*, **101**: 849-856.
- Nitta, K. y Kobayashi, F. (1999). Brewers yeast as health foodstuff. *New Food Ind.* (Japan), **41**:17-23.
- Nom-188-SSA1-2000, Norma Oficial Mexicana. Control de Aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal.

- Olejniak, A.; Lewandowaka, M.; Obarska, M. y Wlodzimierz, G. (2005). Tolerance of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains to low pH, bile salt and digestive enzymes. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*. **8**:1.
- Ortiz, A.; Reuto, J.; Fajardo, E.; Sarmiento, S.; Aguirre, A.; Arbeláez, G.; Gómez, D.; Quevedo-Hidalgo, B. (2008). Evaluación de la capacidad probiótica in vitro de una cepa native de *Saccharomyces cerevisiae*. *Universitas Scientiarum*, **13**: 138-148. Disponible en línea en: www.javeriana.edu.co/universitas_scientiarum
- Otero-Rambla, M.; García, R.; Pérez, M.; Martínez, J.; Vasallo, M.; Saura, G. y Bello, D. (2009). Producción de bioetanol a partir de mezclas de jugos-melazas de caña de azúcar. *Redalyc*, **43**: 17-22. Disponible en línea en: <http://www.redalyc.org/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=223120657003>
- Ouwehand, A.C., Niemi, P. y Salminen, S.J. (1999). The normal microflora does not affect the adhesion of probiotics bacteria in vitro. *FEMS Microbiol. Lett.*, **177**: 35-38.
- Oyetayo, V.O, y Oyetayo, F.L. (2005). Potencial of Probiotics as Biotherapeutic Agents Targeting the Innate Immune System. *Afr J Biotechnol*, **4**: 123-127.
- Pardo, S.; Galvagno, M.A. y Cerrutti, P., (2009). Estudios de la viabilidad y la vitalidad frente al congelado de la levadura prebiótica *Saccharomyces boulardii*: efecto del preacondicionamiento fisiológico. *Rev Iberoam Micol*, **26**: 155-160.
- Park, J.; Smalley, E. y Chu, F. (1996). Natural occurrence of Fusarium mycotoxins in field samples from the 1992 Wisconsin corn crop. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 1642-1648.
- Pascual, M. y Calderon, V. (2000). Microbiología Alimentaria. Segunda Edición. Madrid. España.
- Passone, M.A.; Resnik, S. y Etcheverry, M.G. (2007). Antiaflatoxigenic property of food grade antioxidants under different conditions of water activity in peanut grains. *Int J Food Microbiol*. **15**; 118:8-14
- Paz Astudillo, I. (2010). Diseño integral de biorreactores continuos de tanque agitado aplicados a procesos de fermentación. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, Colombia.
- Paz, S.; Pellegrini, A.G.; Fornari, M.C.; Tapia, J.S. y Diez, A.R. (2003). Observación preliminar: Efectos de la suplementación dietaria con levadura de cerveza (*Saccharomyces uvarium*) sobre el estallido respiratorio de neutrófilos en equinos criollos en entrenamiento. *Vet. Méx.*, **34**:103-110
- Peltonen, K.; El-Nezami, H.; Haskard, C.H.; Ahokas, J. y Salminen, S. (2001). Aflatoxin B₁ binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J. Dairy Science* **84**: 2152-2156.

- Pena GA, Pereyra CM, Armando MR, Chiacchiera SM, Magnoli CE, Orlando JL, Dalcero AM y Cavaglieri LR (2009). *Aspergillus fumigatus* toxicity and gliotoxin natural incidence in feedstuffs intended to domestic animals and pets. *Letters in Applied Microbiology*. **50**: 77-81.
- Pereyra, C.M.; Alonso, V.A.; Rosa, C.A.R.; Chiacchiera, S.M.; Dalcero, A.M.; Cavaglieri, L.R. (2008). Gliotoxin natural incidence of *Aspergillus fumigatus* isolated from corn silage and ready dairy cattle feed. *World Mycotoxin Journal*, **1**: 457-462.
- Pereyra ,C.; Pena, G.; Cavaglieri, L.; Krüger, C.D.; Keller, K.M.; Rosa, C.A.R.; Chiacchiera, S.M.; Dalcero A.M. (2009). Influence of poultry feed processing on mycobiota and ochratoxin and citrinin co-occurrence. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, **31**: 51-58.
- Pereyra ,C.; Chiacchiera, S.M.; Rosa, C.A.R; Salgero, R.; Dalcero A.M. y Cavaglieri, L (2011)a. Comparative analysis of the mycobiota and mycotoxins contaminating corn trench silos and silo bags. *J Sci Food Agric*. **91**: 1474-81.
- Pereyra ,C.; Cavaglieri, L; Chiacchiera, S.M. y R.; Dalcero A.M. (2011)b. Mycobiota and mycotoxins contamination in raw materials and finished feed intended for fattening pigs production in eastern Argentina. *Vet Res Commun*. DOI 10.1007/s11259-011-9483-9.
- Pérez, M. (2000). Obtención de un hidrolizado de crema de levadura de destilería y evaluación de su actividad probiótica. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Agraria de La Habana. Cuba.
- Pérez Sotelo, L.S.; Talavera Rojas, M.; Monroy Salazar, H.G.; Lagunas Bernabé, S.; Cuarón Ibarquengoitia, J. y Vázquez Chagoyán, J.C. (2005). Evaluación *in vitro* de la capacidad de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* Sc47 para adherir a su pared *Salmonella* spp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, **47**: 70-75.
- Pérez-Torrado, R. (2004). Estudio y mejora del proceso de producción industrial de levaduras vínicas Universitat de València. Tipo de referencia: Tesis
- Perozo, F.; Rivera, S.; Finol, G. y Mavárez, Y. (2003). Aflatoxina B₁, selenio y *Saccharomyces cerevisiae* en la respuesta inmune de pollos de engorde en el estado Zulia, Venezuela. *Revista científica, FCV-LUZ*. **13**: 360-370.
- Petersson S., Hansen M.W., Axberg K., Hult K. y Schnrer J. (1998). Ochratoxin A accumulation in cultures of *Penicillium verrucosum* with the antagonistic yeast *Pichia anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycological Research*, **102**:1003–1008.

- Petersson, S. y Schürer, J. (1995). Biocontrol of mold growth in highmoisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* **61**:1027-1032
- Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (1997). Fungi and food spoilage. CSIRO Division of Food Science and Technology Sydney Academic, Press. Australia.
- Pitt, J. I. y Hocking, A.D. (1999). Fungi and food stollage. Second edition. Gaithersburg, Maryland.
- Pitt JI y Hocking AD. (2009). Fungi and food spoilage. Third edition. CSIRO *Division of food Science and Technology Sydney Academic*, Press. Australia.
- Pittet, A., (1998). Natural occurrence of mycotoxins in food and feeds-an updated review. *Revue Méd. Vét.*, **149**: 479-492.
- Plackett, R. L. y Burman, J. P. (1946). The design of optimum multi-factorial experiments. *Biometrika* **33**: 305-325.
- Pleština, R. (1992). Some features of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem. Toxicol.*, **30**:177-181.
- Polonelli, L., Dettori, G., Cattell, C. y Morace, G. (1987). Biotyping of micelial fungus cultures by the killer system. *European Journal of Epidemiology*, **3**: 237-42.
- Polonelli, L. y Morace, G. (1986). Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *Journal of Clinical Microbiology* **24**: 866-869.
- Postma, E.; Kuiper, A.; Tomasouw, W.F.; Scheffers, W.A. y van Dijken, J.P. (1989). Competition for glucose between the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*. *Appl Environ Microbiol.* **55**: 3214-20.
- Psomas, E.; Andrighetto, C.; Litopoulou-Tzanetaki, E.; Lombardi, A. y Tzanetakis, N., (2001). Some probiotics properties of yeast isolates from infant faeces and fetal cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, **69**: 125-133.
- Quinn, G.P. y Keough, M.J. (2002) *Experimental Design Data analysis for biologists*. Cambridge University Press .Cambridge, United Kingdom.
- Raju, M.V. y Devegowda, G. (2000). Influence of esterified glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and hematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin. *Br. Poult. Sci.* **41**: 640-650.
- Ramos, A.J. y Hernandez, E. (1996). In vitro aflatoxin adsorption by means of a montmorillonite silicate. A study of adsorption isotherms. *Animal Feed Sci. Technology* **62**: 263-269.
- Ringot, D.; Benoit, L.; Chaplain, K.; Bonhoure, J.; Auclair, E.; Larondelle, Y. (2007). *In vitro* biosorption of ochratoxin A on the yeast industry by-products: Comparison of isotherm models. *Bioresour. Techno.* **98**:1812-1821.

- Rivas, J.; Bastidas, P.; Díaz, T.; Hahn, M. y Moya, A. (2006). Efecto de la suplementación con *Saccharomyces cerevisiae* sobre el comportamiento reproductivo en rebaños lecheros de la zona alta del estado Mérida. *Zoot Trop* **24**: 379-391.
- Robens, F. and Riley, R.T. (2002). Special Issue: Aflatoxin/ Fumonisin Elimination and Fungal Genomics Workshops, Phoenix, Arizona, October 23-26, 2001. *Mycopathologia*, **55**: 1-122.
- Rodrigues, A.C.P.; Cara, D.C.; Fretez, H.G.G., Cunha, F.Q.; Vieira, E.C.; Nicoli, J.K. y Vieira, L.Q. (2000). *Saccharomyces boulardii* stimulates slgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *J. Appl. Microbiol.*, **89**: 404-414.
- Rojas, D.F.; Garrido M.F. y Bonilla, R.R. (2009). Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, **10**: 70-80.
- Rolfe, R. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of Nutrition*, **130**: 396S-402S.
- Roth A, Chakor K, Creppy EE, Kane A, Roßschenthaler R, Dirheimer G. (1988). Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. *Toxicology* **48**: 293-308
- Rubio, A.; Hernández, M.; Aguirre, A. y Poutou, R. (2008). Identificación preliminar in vitro de propiedades probióticas en cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev.MVZ Córdoba*, **13**: 1157-1169.
- Saunders, D.; Meredith, F. y Voss, A. (2001). Control of fumonisin: effects of processing. *Environ Health Perspect.* **109**: 333-336.
- Savage, T. y Elzbieta, Z. (1996). The Effect of Feeding a Mannan Oligosaccharide on Immunoglobulins, Plasma IgG and Bile IgA of Wrolstad MW Male Turkeys. Seventeenth Annual Meeting of the Southern Poultry Science Society. January 22-23. World Congress Center Atlanta. Georgia. P. 148.
- Shahin, A.A.M. (2007). Removal of aflatoxin B₁ from contaminated liquid media by dairy lactic acid bacteria. *International Journal of Agriculture Biology*, **9**: 71-75.
- Scholz, W.; Garcia-Diaz, D.; Rieque, D.; Cruz-Suarez, L.E.; Vargas-Albares, F. y Latchford, J. (1999). Enhancement of vivriosis resistance in juvenile *Pennaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture*. **176**: 271-283.
- Schreuder, M.; Mooren, A.; Toschka, H.; Verrips, C. y Klis, F. (1996). Immobilizing proteins on the surface of yeast cell. *Trends-Biotechnol.* Apr, **14**: 115-120.
- Schwarzer, K. (2002). Reducing zearalenone impact on semen quality. *Pig Progress*, **18**: 33-35.

- Scott PM. (1994). *Penicillium* and *Aspergillus* toxins. En: Mycotoxin in grain. Compounds other than aflatoxin. Miller JD y Trenholm HL. (eds.). Eagan Press USA. 261-286.
- Scudamore K.A., Hetmanski MT, Chan HK y Collins S. (1997). Occurrence of mycotoxins in raw ingredients used for animal feeding stuffs in the United Kingdom in 1992. *Food Additives and Contaminants*. **14**: 157-173.
- Scudamore, K.A. y Macdonald, S.J., (1998). A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean-up. *Food Addit. Contam.* **15**: 401-410.
- Scudamore, K.A. y Patel, S. (2000). Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **17**: 407-416.
- Scudamore, K. (2005). Prevention of ochratoxin A in commodities and likely effects of processing fractionation and animal feeds. *Food Addit Contam.*, **22**:17-25.
- Seglar, B. (2004) Efectos de micotoxinas en ganado lechero. Available online:<http://www.asaga.org.ar/magazine/n53/>.
- Shetty, P.H.; Hald, B. y Jespersen, L (2007). Surface binding of aflatoxin B₁ by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, **113**: 41-46
- Shetty, P.H. y Jespersen, L. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Sci. and Technology*, **17**: 48-55.
- Simas, M.S.; Botura, M.B.; Correa, B.; Sabino, M.; Mallmann, C.A.; Bitencourt, T.C.; Batatinha, M.J. (2007). Determination of fungal microbiota and mycotoxins in brewers grain used in dairy cattle feeding in the State of Bahia, Brazil. *Food Con*, **18**: 404-408
- Singh, S.K, Ahmed, S.U y Pandey, A. (2006). Metabolic engineering approaches for lactic acid production. *Process Biochem.*; **41**: 991-1000.
- Skountzou, P.; Soupioni, M.; Bekatorou, A.; Kanellaki, M.; Koutinas, A; Marchant, R. y Banat, I. (2003). Lead(II) uptake during baker's yeast production by aerobic fermentation of molasses. *Process Biochemistry*, **38**: 1479-1482.
- Sourabh, A.; Kanwar, S. y Sharma, O. (2011). Screening of indigenous yeast isolates obtained from traditional fermented foods of Western Himalayas for probiotic attributes. *Journal of Yeast and Fungal Research*, **2**: 117-126.
- Stanley, V.; Chukwu, H.; Gray, C. y Dawson, T. (1996). Effect of Lactose and BIO-MOS in Dietary Application on Growth and Total Coliform Bacteria Reduction in

- Broiler Chicks. Seventeenth Annual Meeting of the Southern Poultry Science Society. January 22-23. World Congress Center Atlanta. Georgia. p. 61.
- Stanley, V.G.; Ojo, R.; Woldensenbet, S. y Hutchinson, D.H. (1993). The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxins in broiler chicks. *Poultry*, **72**:1867-1872.
- Stringer, D.A. (1982). Industrial development and evaluation of new protein sources: microorganisms. *The Proceedings of the Nutrition Society*, **41**: 289-300
- Strobel, R., y G. Sullivan. (1999). Experimental design for improvement of fermentations, p. 80-93. En A. Demain y J. Davies (ed.), Manual of industrial microbiology and biotechnology. ASM Press, Washington, D.C.
- Tanaka, T.; Yamamoto, S.; Hasegawa, A.; Aoki, N.; Besling, J.R.; Sugiura, Y. y Ueno, Y. (1990). A survey of the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone, in cereals harvested in the Netherlands. *Mycopathologia*, **110**: 19-22.
- Téllez, D. (2004). Caracterización de las melazas empleadas en el proceso fermentativo de la destilería San Martín – Industria de Licores del Valle. Trabajo de grado. Universidad del Valle, Santiago de Cali.
- Teo, A.L. y Tan, H. (2005). Inhibition of *Clostridium perfringens* by a Novel Strain of *Bacillus subtilis* Isolated from the Gastrointestinal Tracts of Healthy Chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4185-4190.
- Trucksess, M.W.; Stack, M.E.; Nesheim, S.; Albert, R.H. y Romer, T.R. (1994). Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts and pistachio nuts: collaborative Study. *J. Assoc. Anal. Chem.* **77**: 1512-1521.
- Valente, P.; Ramos, J. y Leoncini, O. (1999). Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. *Canadian J. Microbiol.*, **45**: 949-958.
- Valero, A., Farré, J.R., Sanchis, V., Ramos, A.J., Marín, S. (2006). Effects of fungal interaction on ochratoxin A production by *A. carbonarius* at different temperatures and aw. *International Journal of Food Microbiology*, **110**: 160-164.
- Van der Aa Kühle, A.; Skovgaard, K. y Jespersen, L. (2005). *In vitro* screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int. J. Food Microbiol.*, **101**: 29-39.
- Van Egmond H.; Schothorst R. y Jonker, M. (2007). Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. *Anal Bioanal Chem.*, **389**:147-57.

- Van Heugten, E.; Funderburke, W. y Dorton, K.L. (2003). Growth performance, nutrient digestibility and fecal microflora in weanling pigs fed live yeast. *J. Anim. Sci.*, **81**: 1004-1012.
- Van Uden, N.; Carmo-Sousa, L. y Farinha, M. (1958). On the intestinal yeast flora of horses, sheep, goats and swine. *J. Gen. Microbiol.*, **19**: 435-445, ISSN: 1350-0872.
- Vargas, E.A.; Preis, R.A.; Castro, L. y Silva, C.M.G. (2001). Co-occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, zearalenone and fumonisin B₁ in Brazilian corn. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **18**: 981-986.
- Varga J, Kevei E, Rinyu E, Téren J y Kozakiewicz Z. (1996). Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**:4461-4464.
- Walker, R. (2002). Risk assessment of ochratoxin: current views of the European Scientific Committee on Food, the JECFA and the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **504**: 249–255.
- White, L.A.; Newman, M.C.; Cromwell, G.L. y Lindemann, M.D. (2002). Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. *J. Anim. Sci.*, **80**: 2619-2628
- White, T.; Bruns, T.; Lee, S. y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, MA; Gelfand, DA; Sninsky, JJ and White, TJ. (eds.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, NY, USA, pp. 315-322.
- Whitlow, LW. y Hagler, WM., (2002). Mycotoxins in feeds. *Feedstuffs*. **74**: 1-10.
- Wicklow, D.T.; Horn, B.W.; Shotwell, O.L.; Hesseltine, C.W. y Caldwell, R.W., (1988). Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize grown in a controlled environment. *Phytopathology*, **78**: 68-74.
- Wolf, K. (1996). *Nonconventional Yeast in Biotechnology. A Handbook.*; Berlin: Springer Verlag. 618p.
- Wood, E. (1992). Mycotoxins in food and feeds in the United States. *J. Anim. Sci.*, **70**: 3941-3949.
- Yépez, Y. (2005). Selección de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con alta productividad de etanol y que tolere mayores niveles de azúcar que los usados en la Planta Alcoquímica Sucromiles S.A. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Yiannikouris, A.; Francois, J.; Poughon, L.; Dussap, C.G.; Bertin, G.; Jeminet, G. y Jouany, J.P. (2004). Alkali Extraction of β -D-Glucans from *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall and Study of Their Adsorptive Properties toward Zearalenone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 3666-3673.

- Yiannikouris, A.; Francois, J.; Poughon, L.; Dussap, C.G.; Jeminet, G.; Bertin, G.; y Jouany, J.P. (2004). Influence of pH on Complexing of Model β -D-Glucans with Zearalenone. *Journal of Food Protection*, **67**: 2741-2746.
- Yiannikouris, A.; Gwénaëlle, A.; Poughon, L.; François, J.; Dussap, C.G.; Jeminet, G.; Bertin, G.; Bertin, G. y Jouany, J.P. (2006). Chemical and Conformational Study of the Interactions Involved in Mycotoxin Complexation with β -d-Glucans. *Biomacromolecules*, **7**: 1147-1155.
- Yoshizawa, T. (1991). Natural occurrence of mycotoxins in small grain cereals (wheat, barley, oat, shorgum, millet, rice). In: Smith, J.E., Henderson, R.S. (Ed.) *Mycotoxins and animal foods*. p. 301-324.
- Zhang, H., Zheng, X., Wang, L., Li, S. y Liu, R. (2007). Effect of yeast antagonistic in combination with hot water dips on postharvest *Rhizopus* rot or strawberries. *Journal of Food Engineering*, **78**: 281-287.
- Zhen-Ming Chi; Guanglei Liu; Shoufeng Zhao; Jing Li y Ying Peng. (2010). Marine yeast as biocontrol agents and producers of bio-products. *App. Microbiol Biotechnol.* **86**: 1227-1241.
- Zinedine, A., Faid, M. and Benlemlih, M. (2005). In vitro reduction of aflatoxin B₁ by strains of lactic acid bacteria isolated from Moroccan sourdough bread. *Int. J. Agr. Biol.* **7**: 67-70.
- Zumbado-Rivera, W.; Esquivel-Rodriguez, P.; Wong-González, E. (2006). Selección de una levadura para la producción de biomasa: crecimiento en suero de queso. *Agronomía Mesoamericana*, **17**:151-160.

Anexo

1. ANEXO DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

1.1. Medios de cultivo

Agar semisólido o agar soft (0,1 %)

Agar	0,1
Agua destilada	100 mL

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

Agar extracto de levadura peptona dextrosa (YPD)

Extracto de levadura	5 g
Peptona	5 g
Glucosa	40 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

Agar extracto de malta (MEA) (Blakeslee, 1915)

Extracto de malta	20 g
Peptona	1 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

Agar czapek (Cz)

K ₂ HPO ₄	1 g
Czapek concentrado	10 mL
Solución de metales trazas	1 mL
Sacarosa	30 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

Agar czapek extracto de levadura (CYA)

K ₂ HPO ₄	1 g
Czapek concentrado	10 mL
Extracto de levadura	5 g
Sacarosa	30 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

Agar czapek extracto de levadura sacarosa (CY20S)

K ₂ HPO ₄	1 g
Czapek concentrado	10 mL
Extracto de levadura	5 g
Sacarosa	200 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

Agar malta acético 0,5% (AMA)

Extracto de malta	20 g
Peptona	1 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL
Ácido acético glacial	5 mL

Agregar al medio templado, luego de su esterilización, 5 mL de ácido acético glacial, de modo que tenga una concentración final de 0,5% de ácido. Mezclar bien antes de fraccionar.

Agar extracto de malta extracto de levadura 50% de Glucosa (MY50G)

Extracto de malta	10 g
Extracto de levadura	2,5 g
Agar	10 g
Agua destilada	500 mL
Glucosa	500 g

Agregar los constituyentes menores en primer término junto con el agar a 450 mL de agua destilada. Calentar para disolver el agar. Llevar con el restante de agua destilada a volumen final de 500 mL. Agregar la glucosa y homogeneizar para evitar la formación de grumos; en caso de formarse, disolverlos por calentamiento.

Esterilizar en autoclave a vapor fluente por 30 min.

Agar extracto de levadura CINA 10% Glucosa 12% (MY 10-12)

Extracto de malta	20 g
-------------------	------

Extracto de levadura	5 g
CINa	100 g
Glucosa	120 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave a vapor fluente por 30 minutos.

Agar nitrato glicerol al 25% (G25N)

KH ₂ PO ₄	0,75 g
Czapek concentrado	10 mL
Extracto de levadura	3,70 g
Glicerol grado analítico	250 g
Agar	12 g
Agua destilada	750 mL

Esterilizar en autoclave a vapor fluente por 30 minutos.

Agar papa glucosado (APG)

Papa	250 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

Se cortaron en trozos papas lavadas sin pelar, se hidrataron con 500 mL de agua y se cocinaron a vapor fluente durante 45 minutos. Por otro lado se esterilizó el agar en 500 ml de agua destilada. Se filtró el caldo con las papas a través de gasa y se adicionó el

agar disuelto. La pulpa de la papa restante se homogeneizó para obtener un puré y la mitad de éste se adicionó al agar junto con la glucosa, luego se llevó a volumen con agua destilada (1000 mL). Se fraccionó el medio en tubos de ensayo, se esterilizaron en autoclave a 3/4 de atmósfera durante 20 minutos y se dejaron inclinados a solidificar.

Agar agua (AA)

Agar	10 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave a vapor fluente por 30 minutos.

Agar hojas de clavel (AHC)

Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

El medio se preparó colocando 1 a 5 hojas de clavel estériles en placas de Petri de 6 cm por 15 mm y se agregó AHC al 2% enfriado a 45°C. Se almacenó 3 o 4 días previo a su uso para determinar posibles contaminantes provenientes de las hojas.

Caldo extracto de levadura peptona dextrosa (Caldo YPD)

Extracto de levadura	5 g
Peptona	5 g
Glucosa	40 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

Medio esencial mínimo (DMEM)

Glucosa	4 g L ⁻¹
Bicarbonato sódico	3,7 g L ⁻¹
FBS	10%
L-glutamina	2 mM
Estreptomicina	100 µg mL ⁻¹
Anfotericina	5 µg mL ⁻¹
Gentamicina	1 µg mL ⁻¹

1.2. Soluciones**Agua Peptonada 0,1%**

Peptona	1 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Glicerol al 30%

Glicerol	300 g
Agua destilada	700 mL

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Solución stock de dicloran:

Dicloran	200 mg
Etanol	100 mL

Solución stock de cloranfenicol

Cloranfenicol	250 g
Etanol (95%)	1000 mL

Solución rosa de bengala

Rosa de bengala	25 mg
Etanol (95%)	30 mL
Agua destilada	100 mL

Solución stock de sulfato de estreptomicina

Sulfato de estreptomicina	5 g
Agua destilada	1000 mL

Solución stock de sulfato de neomicina

Sulfato de Neomicina	1 g
Agua destilada	1000 mL

Solución czapek concentrada

Sulfato de hierro	10 mg
Nitrato de sodio	3 g
Cloruro de potasio	0,5 g
Sulfato de magnesio	0,5 g
Agua destilada	100 mL

Buffer fosfatos

- ✓ Solución A (NaH_2PO_4 0,2 M): disolver 27.6 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua destilada, completando 1 L.

- ✓ Solución B (Na_2HPO_4 0,2 M): 53.65 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_7$ se disuelven en agua destilada, llevando el volumen final a 1 L.

Solución A (mL)	Solución B (mL)	Agua destilada (mL)	pH
407,5	92,5	500	6,2
342,5	157,5	500	6,5
255	245	500	6,8

Soluciones gastrointestinales artificiales

Solución A: lisozima 2 mg mL^{-1} (Sigma 47700 U mg^{-1}) en solución salina pH 6,5.

Solución B: jugo gástrico artificial con la siguiente composición: ClNa 125 mM; ClK 7mM; NaHCO_3 45 mM, Pepsina 3 g L^{-1} (Sigma 427 U mg^{-1}) y HCl en concentración variable entre 80 y 100 mM para ajustar el pH final a 3.

Solución C: Bilis 0,3 % (w/v); tripsina 1 mg mL^{-1} (Fluka 11531 U mg^{-1}), y quimiotripsina 1 mg mL^{-1} (Fluka 80 U/mg). El pH fue ajustado a 8 con NaOH 5N.

1.2.5. Soluciones de micotoxinas

Solución de aflatoxina B₁: AFB₁ (Sigma) fue resuspendida en benceno: acetonitrilo (98:2 v/v) a una concentración de 2 mg mL^{-1} , se evaporó bajo atmósfera de N_2 y se resuspendió en metanol. A partir de esta solución la micotoxina fue diluida en PBS hasta obtener la concentración deseada.

Solución de zearalenona: ZEA (Sigma) fue resuspendida en benceno: acetonitrilo (98:2 v/v) a una concentración de 2 mg mL^{-1} , se evaporó bajo atmósfera de N_2 y se resuspendió en metanol. A partir de esta solución la micotoxina fue diluida en PBS hasta obtener la concentración deseada.

Solución de ocratoxina A: OTA (Sigma) fue resuspendida en PBS pH 7,3 preparadas a partir de una solución stock en metanol 10 mL^{-1} . El solvente fue evaporado a sequedad en baño de María (70°C , 10-15 min.) previo a la preparación de la solución de trabajo en PBS.

Solución derivatizante para Aflatoxinas

Acido trifluoroacético	20 mL
Ácido acético glacial	10 mL
Agua destilada	70 mL

Tinción Giemsa:

- ✓ Secar los extendidos al aire.
- ✓ Cubrir las muestras con metanol (3-5 min).
- ✓ Escurrir.
- ✓ Cubrir la muestra tratada con solución de Giemsa 15-20 min.
- ✓ Lavar los portaobjetos con agua corriente.
- ✓ Dejar secar.

La solución Giemsa debe ser preparada en el momento de su utilización, agregando 2 gotas de colorante por mililitro de solución Buffer.



U N R C
Biblioteca Central



71217

71217

